

**José Antônio Diniz Faria Júnior**

**Papel da variação do número de cópias genômicas na etiologia de  
pacientes sindrômicos com diferenças/distúrbios do  
desenvolvimento sexual**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Sorahia Domenice

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.  
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo**

**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Faria Júnior, José Antônio Diniz  
Papel da variação do número de cópias genômicas na  
etiologia de pacientes sindrômicos com  
diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual /  
José Antônio Diniz Faria Júnior. -- São Paulo, 2021.  
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Endocrinologia.  
Orientadora: Sorahia Domenice.

Descritores: 1.Transtornos 46, XX do  
desenvolvimento sexual 2.Síndrome adrenogenital  
3.Disgenesia gonadal 4.Transtornos ovotesticulares  
do desenvolvimento sexual 5.Transtornos do  
cromossomo sexual no desenvolvimento sexual  
6.Polimorfismo de nucleotídeo único 7.Deleção  
cromossômica 8.Duplicação cromossômica

USP/FM/DBD-199/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

## **Dedicatória**

Aos pacientes

Por nos mostrarem valores que os livros e artigos nunca serão capazes de revelar.

## Agradecimentos

Aos meus Pais, Carmen e José, que sempre me inspiraram e me deram toda a base necessária para atingir qualquer sonho que por ventura tivesse. Pelo amor incondicional demonstrado desde o dia em que nasci.

Aos meus irmãos, Victor e Natalia, por sempre estarem presentes mesmo que distantes. Amo vocês. Agradecer também as famílias lindas que os dois construíram e por fazer parte dela.

A Bruno, companheiro inseparável dos últimos 7 anos. Não imagino essa caminhada sem você ao meu lado.

Aos meus avós, Janice/Izaurino e Francisco/Maria, por terem sido pessoas fundamentais enquanto eu crescia, cada um com a sua maneira peculiar de amar.

Aos tios do coração, Adalto e Hugo, foi maravilhoso poder passar todas as férias de infância ao lado de vocês.

Às amigas de toda uma vida, aqui representados por Pedro, Maira e Kênia, desde os tempos da escola.

À amiga e colega de trabalho, Lu, por sempre me incentivar a atingir mais e mais, pelas boas risadas e pelo companheirismo dos ambulatórios DDS/Trans da Bahia. Aos amigos e companheiros do ambulatório DDS UFBA, Renata e Betânea, agradeço a oportunidade de tanto aprendizado com vocês.

Aos propedêuticos, Livinha, Dino, Emy, Lourival, Paula e Renata, melhores amigos que a faculdade me deu.

À Grande Bahia, panela que me acompanhou durante minha residência de Pediatria e que se tornou uma irmandade. Às amigas da residência de endocrinologia pediátrica, sem vocês o caminho seria muito mais difícil.

Aos amigos do peito que o Doutorado me deu (Dani, Rafa e Nat), sem vocês nada seria igual e o mundo do doutorado menos colorido. Tivemos uma comunhão perfeita entre os 4 pós-graduandos do DDS, cada um com a sua personalidade, cada um à sua maneira, que ao se unirem formaram um grupo forte e coeso. Em especial, agradecer a Dani, minha companheira das quartas-feiras do doutorado, um dos melhores seres humanos que já conheci. Sorte a minha ter te encontrado para trilharmos juntos nossa pós-graduação.

Aos amigos irmãos, que se não tivesse ido para SP nunca teria encontrado. Agradeço especialmente à Tati e Vivi, Claralice, Bruna Moreira, Nadia, Dani Nemer, Bruna Abilio e Sil. São Paulo tem as cores da nossa amizade.

À Faculdade de Medicina da Bahia, minha primeira casa no caminho da Medicina e onde pude retornar como professor de Pediatria.

À Faculdade de Medicina da USP, especialmente ao Instituto da Criança da USP, minha casa em SP por 6 anos, onde pude complementar minha formação em Pediatria e Endocrinologia. Foi uma honra fazer parte da equipe assistencial da Enfermaria de Especialidades e do SCUT. Só tenho a agradecer aos grandes mestres desse templo da Medicina e da Pediatria. Agradeço em especial a Dra. Angelina, grande mestra e hoje amiga. Obrigado por todos os ensinamentos.

Aos residentes de Pediatria da USP que tive a honra de ajudar a formar. Ensinar e aprender diariamente com vocês foi uma das maiores conquistas de ter atuado como médico assistente do ICR/USP.

Ao grupo do DDS do HC. Em especial à minha orientadora Dra. Sorahia, Profa. Berenice e Dra. Elaine. Fazer parte desse grupo de ponta e poder estudar DDS com as melhores é puro privilégio. Aos amigos do LIM 42, em especial a Miran, por todo o suporte e bondade para que pudesse desenvolver meu trabalho.

À minha orientadora do Doutorado, Dra. Sorahia Domenice. Acredito que cada um tem a orientação que merece. Ainda estou tentando descobrir o motivo de ter merecido tanto. Obrigado por todos os ensinamentos, conselhos e acolhidas. Agradeço a Deus por ter tido a oportunidade de ser seu aluno.

Aos grandes mestres da Endocrinologia Pediátrica do ICR-FMUSP, aqui representados pelo agradecimento ao Chefe da Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Dr. Durval Damiani, e a melhor diabetóloga que já conheci, Dra. Thais Della Manna. Vocês foram fundamentais da minha formação. Levarei seus ensinamentos para sempre.

Às professoras titulares da Endocrinologia USP, Dra. Berenice e Dra. Ana Claudia, fonte de inspiração e admiração para todos os pós-graduandos da endocrinologia da USP. Privilegiados somos nós por podermos desfrutar do convívio diário com profissionais e pessoas tão brilhantes.

## **Normatização Adotada**

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:  
Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).  
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação.  
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Documentação; 2011.  
Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.





## RESUMO

Faria Júnior JAD. *Papel da variação do número de cópias genômicas na etiologia de pacientes síndrômicos com diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

As diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) afetam 1:1000-4500 nascidos vivos, ocorrendo quando o desenvolvimento do sexo cromossômico, gonadal ou genital são atípicos. Didaticamente as DDS são classificadas em grupos de acordo com o cariótipo do paciente (DDS associada a anormalidades cromossômicas, DDS 46,XY, DDS 46,XX), com o tipo de defeito identificado (alterações do desenvolvimento gonadal, defeitos enzimáticos, defeitos no receptor hormonal) e alterações genéticas quando identificadas. O diagnóstico precoce de uma criança portadora de DDS é fundamental para a obtenção de um bom resultado terapêutico e uma boa qualidade de vida. A pesquisa de mutações em genes-alvo pelo tradicional método de Sanger esclarece apenas cerca de 50 % da etiologia das DDS. As novas estratégias de sequenciamento como as técnicas de *array* (SNP *array* e *array* CGH) possibilita a avaliação de todo o genoma em busca de variações do número de cópias gênicas, o que auxilia não só a identificação de variantes patogênicas em genes já conhecidos, como também a identificação de novos *loci* cromossômicos envolvidos na etiologia dos DDS, principalmente em pacientes com múltiplas anormalidades síndrômicas. O objetivo deste estudo foi estabelecer o diagnóstico molecular em pacientes com DDS síndrômicos acompanhados no ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do HC/FMUSP utilizando as metodologias de análise de *array* genômico (SNP-*array*). Vinte e dois pacientes portadores de DDS associadas a alterações síndrômicas em diversos sistemas além do trato genital foram incluídos no estudo e foram submetidos à pesquisa de variações do número de cópias (CNVs) através da técnica de *bead array* utilizando o ensaio *Infinium* CytoSNP-850K *BeadChip*<sup>®</sup> da plataforma Illumina<sup>®</sup> e o CytoScan HD 750K da Affymetrics<sup>®</sup>. As CNVs identificadas foram comparadas com diferentes bancos de dados públicos como: UCSC Genome Browser, Database of Genomic Variants e DECIPHER Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensemble Resources. Um total de 229 CNVs foram identificadas: 126 deleções, 66 duplicações e 37 perdas do estado de heterozigose. O tamanho das CNVs encontradas variou de 2,8Kb a 12,7Mb. Nove CNVs em seis pacientes diferentes foram consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas após análise em ferramentas de predição *in silico*. Em dois pacientes foi estabelecido o diagnóstico

de DDS 46,XX *SRY* + associado ao ganho de cópia genômica de fragmento de 7Mb de Yp. Além dos fragmentos de Y, duas deleções, uma de 1,7Mb na região 3q29 em um paciente e outra de 9Mb na região Xp22.33 em outro paciente, foram reveladas pela técnica de *array*, justificando o fenótipo sindrômico em ambos os pacientes. Duas CNVs patogênicas associadas à atipia genital e características sindrômicas foram identificadas em dois pacientes portadores de DDS 46,XY: uma deleção de 11,6Mb localizada na região cromossômica 10q25.3-26.2 e uma deleção de 10,9Mb na região 13q33.1. Os genes *FGFR2* e *EMX2* (10q) e *EFNB2* (13q) previamente relacionados com o desenvolvimento gonadal em humanos e camundongos apresentavam uma redução no número de cópias nesses pacientes. Em um terceiro paciente DDS 46,XY identificou-se uma duplicação na região 14q11.2-q12 de 6,5 Mb associada a uma deleção na região 21p11.2-q21.3 de 12,7Mb. A síndrome de deleção de genes contíguos 21q é descrita em indivíduos com um espectro de fenotípico amplo, incluindo malformações genitourinárias, cardíacas e neurológicas, porém até o momento nenhum gene candidato nesta região cromossômica foi relacionado à condição de DDS. Em um paciente portador de DDS 46,XY, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e catarata congênita, uma deleção de 12Kb no cromossomo 10 foi associada à condição de catarata congênita. Variantes no gene *PITX3*, contido na região deletada, foram previamente relacionadas a malformações oculares. Nessa região cromossômica, nenhum gene candidato foi associado à condição de DDS. A técnica de SNP-*array* permitiu estabelecer a etiologia molecular em 40% (2 de 5) dos pacientes com DSD 46,XX e em 17,6% (3 de 17) dos pacientes com DDS 46,XY. Em um dos pacientes DDS 46,XY os achados no *array* contribuiu para esclarecer parcialmente o fenótipo sindrômico do paciente, mas não condição de atipia genital associada. A técnica de *array* contribuiu para o diagnóstico em 27,3% dos pacientes DDS sindrômicos analisados neste estudo.

**Descritores:** Transtornos 46, XX do desenvolvimento sexual; Síndrome adrenogenital; Disgenesia gonadal; Transtornos ovotesticulares do desenvolvimento sexual; Transtornos do cromossomo sexual no desenvolvimento sexual; Polimorfismo de nucleotídeo único; Deleção cromossômica; Duplicação cromossômica.

## ABSTRACT

Faria Júnior JAD. *Evaluation of genomic copy number variations in the etiology of syndromic patients with sexual development disorders* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Differences/disorders of sexual development (DSD) affect 1:1000-4500 live births, occurring when the development of chromosomal, gonadal or genital sex is atypical. Didactically, DSD are classified into groups according to the patient's karyotype (DSD associated with chromosomal abnormalities, 46,XY DSD, 46,XX DSD), with the type of defect identified (changes in gonadal development, enzyme defects, defects in the hormonal receptor) and genetic changes when identified. The early diagnosis of a child with DSD is essential for obtaining a good therapeutic result and a good quality of life. The search for mutations in target genes using the traditional Sanger sequencing method explains only about 50% of the etiology of DDS. New sequencing strategies such as array techniques (SNP array and CGH array) make it possible to evaluate the entire genome in search of variations in the number of gene copies, which helps not only to identify pathogenic variants in already known genes, but also the identification of new chromosomal loci involved in the etiology of DDS, especially in patients with multiple syndromic abnormalities. The objective of this study was to establish the molecular diagnosis in patients with syndromic DSD followed at the outpatient clinic of the Development Endocrinology Unit of HC/FMUSP using the genomic array analysis methodologies (SNP-array). Twenty-two patients with DSD associated with syndromic features in several systems other than the genital tract were included in the study and underwent search for variations in the genomic copy number (CNVs) using the Infinium CytoSNP-850K BeadChip® from the Illumina® platform and the CytoScan HD 750K from Affymetrics®. The identified CNVs were compared with different public databases such as: UCSC Genome Browser, Database of Genomic Variants (DGV) and the Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensemble Resources (DECIPHER). A total of 229 CNVs were identified: 126 deletions, 66 duplications and 37 losses of heterozygosity. The size of the CNVs found ranged from 2.8Kb to 12.7Mb. Nine CNVs in six different patients were considered pathogenic or probably pathogenic after analysis *in silico*. In two patients, a diagnosis of 46,XX *SRY* + DSD was established, associated with the gain of a genomic copy of a 7Mb fragment of Yp. In addition to the Y fragments, two deletions, one of 1.7Mb in the 3q29 region in one patient and another of 9Mb in the Xp22.33 region in another patient, were revealed by the array technique, justifying the

syndromic phenotype in both patients. Two pathogenic CNVs associated with genital atypia and syndromic characteristics were identified in two patients with 46, XY DSD: a 11.6 MB deletion located in the chromosomal region 10q25.3-26.2 and a 10.9 MB deletion in the 13q33.1 region. The *FGFR2* and *EMX2* (10q) and *EFNB2* (13q) are genes previously related to gonadal development in humans and mice and showed a reduction in copy number in these patients. In a third 46,XY DSD patient, we identified a duplication in the 14q11.2-q12 region of 6.5 Mb associated with a deletion in the 21p11.2-q21.3 region of 12.7Mb. The contiguous 21q gene deletion syndrome is described in individuals with a broad phenotypic spectrum, including genitourinary, cardiac and neurological malformations, however, to date, no candidate gene in this chromosomal region has been related to DSD. In a 46,XY DSD patient with delayed neuropsychomotor development and congenital cataract, a 12Kb deletion on chromosome 10 was associated with congenital cataract. Variants in the *PITX3* gene, contained in the deleted region, were previously related to ocular malformations. In this chromosomal region, no candidate gene was associated with DSD. The SNP-array technique allowed to establish the molecular etiology in 40% (2 of 5) of patients with 46,XX DSD and in 17.6% (3 of 17) of patients with 46,XY DSD. In one of the 46,XY DSD patients, the findings in the array contributed to partially clarify the patient's syndromic phenotype, but not the condition of associated genital atypia. The array technique contributed to the diagnosis in 27.3% of the syndromic DSD patients analyzed in this study.

**Descriptors:** 46, XX disorders of sex development; Adrenogenital syndrome; Disgenesia gonadal; Ovotesticular disorders of sex development; Sex chromosome disorders of sex development; Polymorphism, single nucleotide; Chromosome deletion; Chromosomal duplication.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<b>Desenvolvimento da genitália interna a partir de estruturas comuns</b>	<b>21</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Genes e fatores de transcrição envolvidos na determinação gonadal.</b>	<b>22</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Descrição das etapas da técnica de <i>bead array</i> da plataforma Illumina®.</b>	<b>28</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Fluxograma das CNVs obtidas a partir da avaliação dos participantes por SNP-array.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Representação das CNVs patogênicas identificadas no paciente 2.</b>	<b>70</b>
<b>Figura 6</b>	<b>Representação das CNVs patogênicas do paciente 5.</b>	<b>75</b>
<b>Figura 7</b>	<b>Representação da CNV patogênica do paciente 6.</b>	<b>80</b>
<b>Figura 8</b>	<b>Representação da CNV patogênica identificada no paciente 7.</b>	<b>85</b>
<b>Figura 9</b>	<b>Representação da CNV patogênica do paciente 15.</b>	<b>89</b>
<b>Figura 10</b>	<b>Representação da CNV patogênica do paciente 22.</b>	<b>93</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	<b>Classificação dos distúrbios da diferenciação sexual</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 2</b>	<b>Quadros sindrômicos de etiologia genética monogênica que apresentam anormalidades do desenvolvimento sexual</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 3</b>	<b>Critérios utilizados para a classificação das CNVs de acordo com sua patogenicidade</b>	<b>39</b>
<b>Tabela 4</b>	<b>Classificação do DDS, características clínicas e da genitália externa dos participantes do estudo.</b>	<b>42</b>
<b>Tabela 5</b>	<b>Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 6</b>	<b>Conteúdo gênico das CNVs patogênicas e provavelmente patogênicas encontradas nos pacientes através da técnica de SNP-array</b>	<b>62</b>
<b>Tabela 7</b>	<b>Dados da avaliação clínica e hormonais referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia do paciente 2.</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 8</b>	<b>Dados da avaliação clínica e hormonais referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia do paciente 5.</b>	<b>73</b>
<b>Tabela 9</b>	<b>Dados da avaliação clínica e hormonais referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia do paciente 6.</b>	<b>77</b>
<b>Tabela 10</b>	<b>Dados da avaliação clínica e hormonais referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia do paciente 7.</b>	<b>84</b>
<b>Tabela 11</b>	<b>Dados da avaliação clínica e hormonais referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia do paciente 15.</b>	<b>88</b>
<b>Tabela 12</b>	<b>Dados da avaliação clínica e hormonais referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia do paciente 22.</b>	<b>92</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADNPM</b>	Atraso Do Desenvolvimento Neuropsicomotor
<b>ACMG</b>	American College Medical Genetics
<b>ATRX</b>	X-Linked A-Thalassemia And Mental Retardation
<b>AXIN1</b>	Axis Inhibitor 1
<b>BP</b>	Pares De Base
<b>CGH</b>	Hibridação Genômica Comparativa
<b>CHARGE</b>	Coloboma, Heart Anomaly, Choanal Atresia, Retardation, Genital And Ear Anomalies
<b>CHD7</b>	Chromodomain-Helicase-DNA-Binding Protein 7
<b>CLINVAR</b>	Clinically Relevant Variants
<b>CNV</b>	Varição Do Número De Cópias
<b>NR0B1/DAX1</b>	Nuclear Receptor Subfamily 0, Group B, Member 1
<b>DDS</b>	Diferenças/Distúrbios Do Desenvolvimento Sexual
<b>DECIPHER</b>	Database Of Chromosomal Imbalance And Phenotype In Humans Using Ensemble Resources
<b>Del</b>	Deleção
<b>DGV</b>	Database Of Genomic Variants
<b>DHH</b>	Desert Hedgehog Signaling Molecule
<b>DHT</b>	Diidrotestosterona
<b>DLG1</b>	Discs Large Maguk Scaffold Protein 1
<b>DMRT1</b>	Doublesex- And Mab3-Related Transcription Factor 1
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DNPM</b>	Desenvolvimento Neuropsicomotor
<b>Dup</b>	Duplicação
<b>EMX2</b>	Empty Spiracles Homeobox 2
<b>ERK1/2</b>	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2
<b>FGF9</b>	Fibroblast Growth Factor 9
<b>FGFR2</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor 2
<b>FISH</b>	Fluorescent In Situ Hybridization
<b>FMUSP</b>	Faculdade De Medicina Da Universidade De São Paulo
<b>FOG2/ZFPM2</b>	Zinc Finger Protein, Multitype 2
<b>FOXL2</b>	Forkhead Transcription Factor Foxl2
<b>FRAT1</b>	Frequently Rearranged In Advanced T-Cell Lymphomas
<b>FSH</b>	Hormônio Folículo Estimulante
<b>FST</b>	Follistatin
<b>GATA4</b>	Gata Binding Protein 4
<b>GDNF</b>	Glial Cell Derived Neurotrophic Factor
<b>GFRA1</b>	GDNF Family Receptor Alpha 1
<b>HAM/AMH</b>	Hormonio Antimulleriano
<b>hCG</b>	Gonadotrofina Coriônica Humana
<b>HMX2</b>	H6 Family Homeobox 2
<b>HMX3</b>	H6 Family Homeobox 3
<b>HSD3B2</b>	3-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 2
<b>IMC</b>	Índice De Massa Corporal

<b>KAL1/ANOS1</b>	Kallmann Syndrome Interval Gene 1
<b>Mb</b>	Megabases
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>KCNB1</b>	Potassium Voltage-Gated Channel, Shab-Related Subfamily, Member 1
<b>LADD</b>	Síndrome Lácrimo-Aurículo-Dento-Digital
<b>LH</b>	Hormônio Luteinizante
<b>MAP3K1</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1
<b>MAP3K4</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 4
<b>MAR</b>	Malformação Anorretal
<b>MLPA</b>	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
<b>NR0B1/DAX1</b>	Nuclear Receptor Subfamily 0 Group B Member 1
<b>NR5A1/SF1</b>	Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1/Steroidogenic Factor 1
<b>OMIM</b>	Online Mendelian Inheritance For Man
<b>PAK2</b>	P21 (Rac1) Activated Kinase 2
<b>PAX2</b>	Paired Box 2
<b>PIG</b>	Pequeno Para Idade Gestacional
<b>PITX3</b>	Pituitary Homeobox 3
<b>pLI</b>	Probability Of Being Loss-Of-Function Intolerant
<b>POR</b>	Cytochrome P450 Oxidoreductase
<b>RHOA</b>	Ras Homolog Gene Family, Member A
<b>RNM</b>	Ressonância Nuclear Magnética
<b>RSPO1</b>	R-Spondin 1
<b>SNP</b>	Polimorfismo De Nucleotídeo Único
<b>SOX3</b>	Sry-Box 3
<b>SOX9</b>	SRY-Related, HMG-Box Gene 9
<b>SRD5A2</b>	Steroid 5-Alpha-Reductase 2; Srd5a2
<b>SRY</b>	Sex-Determining Region Y
<b>T</b>	Testosterona
<b>TC</b>	Tomografia Computadorizada
<b>USG</b>	Ultrassonografia
<b>VACTERL/VATER</b>	Malformações Vertebrais, Membros, Cardíacas, Fístula Traqueal E Esofagiana Com Ou Sem Atresia De Esôfago, Renal
<b>VUS</b>	Variante De Significado Incerto
<b>WAGR</b>	Wilms Tumor, Aniridia, Genitourinary Anomalies, And Mental Retardation Syndrome
<b>WNT4</b>	Wnt Family Member 4
<b>WT1</b>	Wilms' Tumour 1



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1 Desenvolvimento sexual normal.....	19
1.2 Diagnóstico molecular nas diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual.....	23
1.3 Citogenética clássica e citogenética molecular aplicadas no estudo das diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual.....	25
1.4 Técnicas de <i>array</i> na investigação das diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual..	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1 Primário:.....	30
2.2 Secundários: .....	30
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>32</b>
4.1 Considerações éticas .....	32
4.2 Pacientes.....	32
4.2.1 Recrutamento e critérios de seleção dos pacientes.....	32
4.2.2 Obtenção de dados retrospectivos.....	32
4.2.3 Avaliação clínica, hormonal e de imagem.....	33
4.3 Material e métodos.....	34
4.3.1 Extração do DNA genômico.....	34
4.3.2 Polimorfismo de único nucleotídeo <i>array</i> ( <i>SNP-array</i> ): <i>Infinium CytoSNP-850K</i> <i>BeadChip</i> <sup>®</sup> da plataforma <i>Illumina</i> <sup>®</sup> .....	35
4.3.3 Polimorfismo de único nucleotídeo <i>array</i> ( <i>SNP-array</i> ): <i>CytoScan HD 750K</i> da <i>Affymetrics</i> .....	36
4.4 Análise <i>in silico</i> dos resultados do <i>SNP-array</i> .....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
5.1 Descrição dos resultados dos <i>arrays</i> nos pacientes com CNV patogênicas ou provavelmente patogênicas.....	65
5.1.1 Paciente 2.....	65
5.1.2 Paciente 5.....	71
5.1.3 Paciente 6.....	76
5.1.4 Paciente 7.....	81
5.1.5 Paciente 15.....	86
5.1.6 Paciente 22.....	91
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>95</b>
6.1 Paciente 2.....	96
6.2 Paciente 5.....	98
6.3 Paciente 6.....	101
6.4 Paciente 7.....	102
6.5 Paciente 15.....	107
6.6 Paciente 22.....	109
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>113</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>114</b>
ANEXO I – TCLE .....	115
ANEXO II – Protocolo De Avaliação Clínico-Laboratorial.....	117

## 1 INTRODUÇÃO

As diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual (DDS) afetam 1:1000-4500 nascidos vivos e são definidos como alterações nas quais o desenvolvimento cromossômico, gonadal ou genital são atípicos (AHMED; BASHAMBOO; LUCAS-HERALD; MCELREAVEY, 2013; OSTRER, 2014). Diversas nomenclaturas foram utilizadas para designar os pacientes com diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual ao longo do tempo, como por exemplo, pseudohermafroditismo, intersexo ou anomalias da diferenciação sexual. Estes termos, no entanto, assumiram conotação pejorativa e foram revistos em 2006 pelo consenso de Chicago, passando a serem chamados genericamente de DDS. O termo obteve melhor aceitação entre pacientes e seus familiares e permitiu uma linguagem universal entre os profissionais da área.

Os DDSs englobam um espectro amplo de anormalidades, o que torna difícil estabelecer um critério ótimo para a classificação destas condições. As classificações utilizadas atualmente apresentam limitações. Didaticamente os DDSs são classificados em grupos de acordo com: (i) o cariótipo do paciente (DDS associado a anormalidades cromossômicas, DDS 46,XY e DDS 46,XX); (ii) o tipo de defeito identificado (alterações do desenvolvimento gonadal, defeitos enzimáticos, defeitos no receptor hormonal, etc); ou (iii) alterações genéticas, quando identificadas (HOUK; HUGHES; AHMED; LEE, 2006; HUGHES, 2008; HUGHES; HOUK; AHMED; LEE, 2006). A classificação das DDS, que será seguida neste texto é apresentada na Tabela 1 e utiliza a nomenclatura mais atualizada, proposta no Consenso de 2006 sobre os estados intersexuais ((HUGHES; HOUK; AHMED; LEE, 2006).

O momento do nascimento de uma criança com DDS é considerado uma emergência endocrinológica, visto que, em algumas condições, a não realização do diagnóstico e tratamento adequado do recém-nascido colocam em risco a sobrevivência da criança. Além disso, diversos questionamentos e angústias prontamente surgem dos familiares e da equipe médica. A impossibilidade de definir o sexo de criação no momento do nascimento, a necessidade de correção cirúrgica futura na maioria dos pacientes e a função reprodutiva incerta do paciente com DDS além de questões relacionadas a gênero e sexualidade são alguns dos maiores desafios e motivo de

preocupação dos familiares e da equipe médica (HUGHES, 2008; ONO; HARLEY, 2013).

**Tabela 1.** Classificação das diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual

DDS cromossômica	DDS 46,XY	DDS 46,XX
47,XXY (síndrome de Klinefelter e variantes)	Distúrbio do desenvolvimento gonadal XY	Distúrbio do desenvolvimento gonadal XX
45,X (síndrome de Turner e variantes)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disgenesia gonadal</li> <li>• Ovotesticular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disgenesia gonadal</li> <li>• Ovotesticular</li> </ul>
45,X/46,XY (disgenesia gonadal mista)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regressão testicular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DDS Testicular</li> </ul>
46,XX/46,XY (quimerismo)	Distúrbios da esteroidogênese e ação androgênica <ul style="list-style-type: none"> <li>• Outros</li> <li>• Síndromes associadas, Persistência dos ductos mullerianos, Testículos evanescentes, Hipospádia ou criptorquidia isolada, ambiental</li> </ul>	Excesso androgênico <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiperplasia adrenal congênita</li> </ul> Fetoplacentária (deficiência de aromatase, POR) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Materna (virilização tumoral, uso medicação)</li> <li>• Outros</li> </ul>

DDS: diferença/distúrbio do desenvolvimento sexual; POR – P450 oxirredutase Fonte: Adaptado de Hughes IA, 2008.

O diagnóstico precoce de uma criança portadora de DDS é fundamental para a obtenção de um bom resultado terapêutico e uma boa qualidade de vida. Além disso, o diagnóstico depende de um serviço com infraestrutura laboratorial, que permita um diagnóstico rápido e preciso e uma equipe multidisciplinar adequadamente preparada para a melhor abordagem da criança e sua família.

### 1.1 Desenvolvimento sexual normal

O processo normal de desenvolvimento sexual em humanos é constituído por uma sequência de eventos tecido e tempo específicos. A interação de inúmeros fatores durante este complexo processo determinará a transformação do tecido gonadal

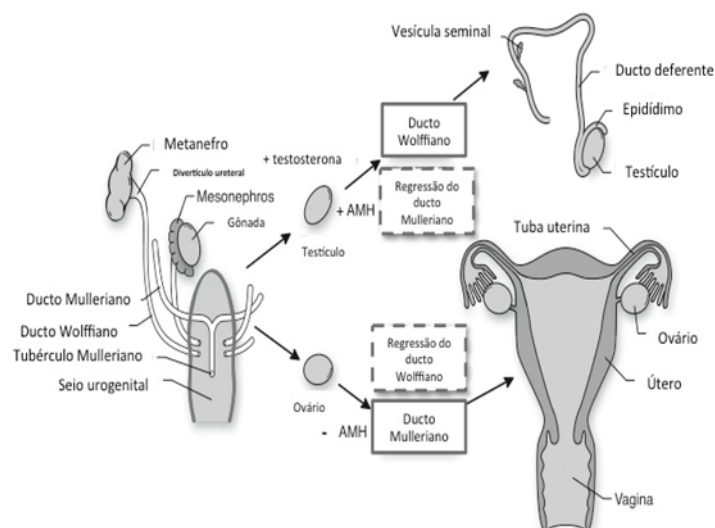
embrionário indiferenciado no tecido gonadal adulto e, por conseguinte, o desenvolvimento genital.

Este processo pode ser dividido didaticamente em 3 etapas: o estabelecimento do sexo cromossômico (46,XX ou 46,XY) após a fecundação; a determinação sexual, durante a qual a gônada bipotencial diferencia-se em testículo ou ovário; e a diferenciação sexual, na qual ocorre o desenvolvimento da genitália interna e externa secundariamente à secreção e ação dos hormônios gonadais fetais e que resultam no fenótipo masculino ou feminino ao nascimento.

Após a fecundação, a presença e correta expressão do gene *SRY*, localizado no braço curto do cromossomo Y nos indivíduos 46,XY, descrita pela primeira vez em 1990, é normalmente suficiente para induzir a cascata gênica masculina e a transformação da gônada bipotencial em testículo (SINCLAIR; BERTA; PALMER; HAWKINS *et al.*, 1990). Na ausência do *SRY*, a gônada bipotencial se diferencia em ovário. Embora, vários mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento ovariano tenham sido esclarecidos, nenhum gene determinante da formação ovariana foi até o momento identificado.

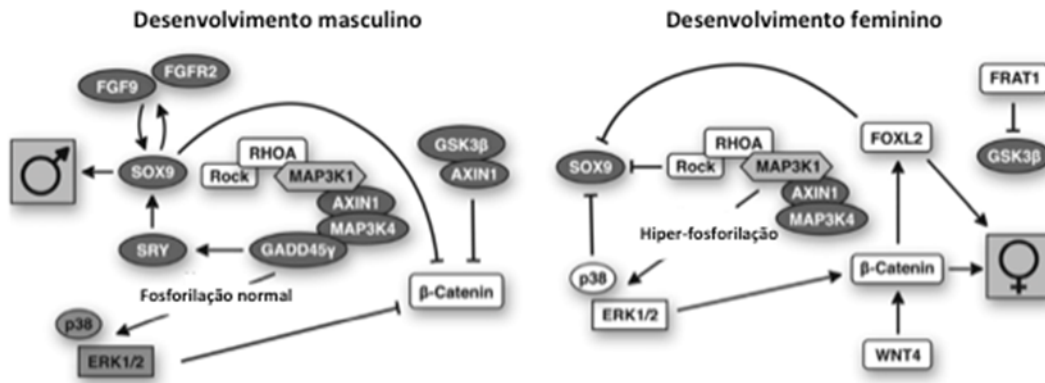
Os hormônios secretados pelos testículos fetais induzem à formação da genitália interna masculina. A ação do hormônio antimulleriano (HAM), secretado pelas células de Sertoli, determina a regressão dos ductos paramesonéfricos e inibe a formação da genitália interna feminina (Figura 1). A produção de testosterona, pelas células de Leydig fetais, promove a diferenciação dos ductos mesonéfricos na genitália interna masculina (vesícula seminal, túbulos deferentes e epidídimo). Na ausência dos hormônios testiculares, HAM e testosterona, os ductos paramesonéfricos se desenvolvem em útero, trompas uterinas e porção superior da vagina e os ductos mesonéfricos regridem (Figura 1).

A genitália externa também se desenvolve a partir de estruturas precursoras comuns aos dois sexos e de forma semelhante ao trato genital interno, a ação hormonal viriliza a genitália externa. A testosterona secretada pelos testículos fetais é convertida periféricamente pela ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase 2 em diidrotestosterona (DHT), que age nos tecidos precursores da genitália externa e leva à formação da genitália externa masculina. Na ausência de ação androgênica ocorre o desenvolvimento da genitália externa feminina.



**Figura 1. Desenvolvimento da genitália interna a partir de estruturas comuns.** Expressão adequada do gene *SRY* desencadeia a diferenciação da gônada bipotencial em testículo e, subsequentemente, da genitália interna masculina a partir da produção de hormônios: Testosterona e hormônio anti-Mulleriano (HAM). Na ausência do *SRY*, o ovário se desenvolve. Ausência de HAM permite o desenvolvimento dos derivados mullerianos em tuba uterina, útero, e terço superior da vagina (Adaptado Ostrer H, 2014).

Os mecanismos genéticos envolvidos nesse complexo processo capaz de levar um feto com uma estrutura gonadal bipotencial a diferenciar-se completamente e atingir fertilidade na vida adulta são elaborados e com múltiplas interações (Figura 2). A expressão de inúmeros genes é controlada por um sistema em forma de cascata, que funciona como um sistema de reforços e de redundância funcional, que constitui um mecanismo para minimizar a ocorrência de fenótipos ambíguos (AHMED; BASHAMBOO; LUCAS-HERALD; MCELREAVEY, 2013; HUGHES, 2008; HUTSON; GROVER; O'CONNELL; PENNELL, 2014; MENDONCA; DOMENICE; ARNHOLD; COSTA, 2009; MOREL; ROUCHER; MALLET; PLOTTON, 2014; ONO; HARLEY, 2013).



**Figura 2. Genes e fatores de transcrição envolvidos na determinação gonadal.** Fatores promotores testiculares e ovarianos são demonstrados em preto e branco, respectivamente. Fatores que promovem a ação de moléculas-alvo são demonstrados como setas. Fatores que bloqueiam a ação das moléculas-alvo são demonstrados como linhas que terminam em barras. Fatores do desenvolvimento masculino: *SRY*, *RAC1*, *MAP3K4* e *AXIN1* promovem a expressão de *SOX9* e, através de uma resposta *feed-forward*, *FGF9*. *MAP3K4*, através de seu cofator *GADD45y*, promove a expressão de *SRY*. *SOX9*, *AXIN1* e *GSK3b* promovem a desestabilização de B-catenina e, portanto, bloqueiam o desenvolvimento ovariano. Desenvolvimento feminino: *RHOA*, *p38* e *ERK1/2* fosforiladas e *FOXL2* reduzem a expressão de *SOX9* e, conseqüentemente, a alça de *feed-forward* resultante, bloqueando o desenvolvimento ovariano. As moléculas *p38* e *ERK1/2* fosforiladas, *AXIN1* (via *GSK3b* desestabilizada) e *FRAT1* promovem a estabilização de  $\beta$ -catenina e aumento de expressão de seus alvos moleculares, *FOXL2* e *FST*. O sequestro possível de *AXIN1* e *MAP3K4* na *MAP3K1* mutante aumenta a estabilização de  $\beta$ -catenina. Mutações com ganho de função no gene *MAP3K1* mimetizam a via de determinação ovariana, superando os fatores de determinação testicular expressos pelo *SRY* (Adaptado Ostrer H, 2014).

Síndrome é um termo utilizado para caracterizar um conjunto de sinais e sintomas que ocorrem concomitantemente em um mesmo indivíduo e que caracterizam uma patologia ou doença específica. Em dismorfologia, síndrome é definida como um conjunto de anormalidades que criam um padrão reconhecido e consistente de anormalidades em indivíduos diferentes. Do ponto de vista genético, características sindrômicas podem ocorrer devido a dois mecanismos principais: 1. Presença de variante patogênica em gene ubíquo em diversos tecidos levando a apresentações de fenótipo múltiplo; 2. Síndrome dos genes contíguos na qual uma microdeleção / microduplicação do genoma afeta diversos genes consecutivos gerando um fenótipo heterogêneo.

Vários genes reconhecidos como componentes da cascata do desenvolvimento sexual foram identificados como associados a quadros sindrômicos em pacientes e em modelos animais *knockout*. Nestes indivíduos, além da presença de anormalidades do trato genital, outros órgãos e outros sistemas são também acometidos. Mutações nos

genes *ATRX* (Disgenesia gonadal 46,XY, malformações corporais, alfa talassemia, retardo mental), *NR5A1/SF1* (Disgenesia gonadal 46,XY com ou sem insuficiência adrenal, Falência ovariana primária), *WT1* (Disgenesia gonadal 46,XY - síndrome de Frasier, síndrome de Denys-Drash, síndrome WAGR), *CHD7* (síndrome de CHARGE), *SOX9* (Disgenesia gonadal 46,XY e Displasia campomélica) são alguns exemplos bem conhecidos de alterações monogênicas levando a fenótipos sindrômicos nas DDSs (Tabela 2) (HUTSON; GROVER; O'CONNELL; PENNELL, 2014). No entanto, diversos pacientes com DDS sindrômicos não preenchem critérios clínicos para nenhuma das síndromes monogênicas classicamente associadas ao DDS, e podem representar um fenótipo associado a síndrome dos genes contíguos.

## 1.2 Diagnóstico molecular nas diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual

Apesar dos DDSs constituírem condições clínicas não infrequentes, o diagnóstico etiológico genético desses pacientes pode não ser estabelecido mesmo após uma intensa investigação laboratorial e molecular.

Diferentemente das pacientes DDS 46,XX, cuja etiologia mais frequente de Hiperplasia Adrenal Congênita secundária a deficiência de enzima 21-hidroxilase é estabelecida pelo perfil hormonal, cerca de metade dos pacientes com DDS 46,XY permanecem sem diagnóstico etiológico estabelecido, apesar da extensa investigação laboratorial e genética realizada (BAETENS; MLADENOV; DELLE CHIAIE; MENTEN *et al.*, 2014; CHAN; BUT; LEE; LAM *et al.*, 2015; IGARASHI; DUNG; SUZUKI; IDA *et al.*, 2013; NORLING; LINDEN HIRSCHBERG; IWARSSON; PERSSON *et al.*, 2013; ONO; HARLEY, 2013). Nestes pacientes, o sequenciamento de genes candidatos “um a um” pelo método de Sanger, na busca por mutações nos inúmeros genes envolvidos no processo de desenvolvimento sexual se mostrou caro, lento e ineficaz (ARBOLEDA; LEE; SANCHEZ; DELOT *et al.*, 2013).

**Tabela 2 - Quadros sindrômicos de etiologia genética monogênica que apresentam anormalidades do desenvolvimento sexual**

	<b>Gene</b>	<b>Locus</b>	<b>Função</b>	<b>Fenótipo em humanos</b>
<b>ARX</b>	<i>Aristaless-related homeobox</i>	Xp22.13	Fator de transcrição	DG 46,XY, epilepsia, retardo do desenvolvimento neuropsicomotor
<b>ATRX</b>	<i>X-linked <math>\alpha</math>-thalassemia and mental retardation</i>	Xq13	Proteína de remodelação da cromatina	DG 46,XY, malformações corporais, alfa talassemia, retardo mental
<b>DHH</b>	<i>Desert hedgehog</i>	12q12-13.1	Molécula sinalizadora	DG 46,XY, polineuropatia fascicular
<b>DSS locus (DAX1)</b>	<i>Dosage sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia, X chromosome 1</i>	Xp21.3	Fator de transcrição	DG 46,XY, face dismórfica, palato fendido, retardo mental facultativo (duplicação do locus DSS)
<b>FOG2/ZFPM2</b>	<i>Friend of GATA 2/ Zinc finger protein multitype 2</i>	8q23.1	Proteína moduladora	DG 46,XY, hipogonadismo hipergonadotrófico com defeito cardíaco congênito
<b>FOXL2</b>	<i>Fork head transcriptional factor 2</i>	3q23	Fator de transcrição	Falência ovariana prematura, síndrome da blefarofimose-ptose-epicanto-inverso
<b>GATA4</b>	<i>GATA-binding protein 4</i>	8p23.1-p22	Fator de transcrição	DG 46,XY com ou sem anormalidade cardíaca
<b>NR5A1/SF1</b>	<i>Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 /Steroidogenic Factor 1</i>	9q33	Fator de transcrição	Ampla espectro de apresentação clínica: DG 46,XY com ou sem insuficiência adrenal, Falência ovariana prematura
<b>RSPO1</b>	<i>R-spondin homolog 1</i>	1p34.3	Molécula sinalizadora	DDS 46,XX testicular ou ovarioteicular, queratose palmoplantar, predisposição carcinoma de pele
<b>SOX3</b>	<i>SRY-related, HMG-box gene 3</i>	Xq27.1	Fator de transcrição	DDS 46,XX testicular, retardo de crescimento e desenvolvimento
<b>SOX9</b>	<i>SRY-related, HMG-box gene 9</i>	17q24.3-25.1	Fator de transcrição	DG 46,XY e Displasia campomélica
<b>WNT4</b>	<i>Wingless-type mmtv integration site family, member 4</i>	1p35	Molécula sinalizadora	síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hausner, agenesia renal, hiperandrogenismo (inativação gênica)
<b>WT1</b>	<i>Wilms' Tumour 1</i>	11p13	Fator de transcrição	DG 46,XY (duplicação gênica) DG 46,XY - síndrome de Frasier, síndrome de Denys-Drash, síndrome WAGR

Por outro lado, estabelecer o diagnóstico etiológico precocemente, permitiria uma melhor avaliação do prognóstico de cada paciente e a realização de um tratamento individualizado, de forma a orientar a família de recém-nascidos com



atipia genital a escolha do sexo de criação com maior segurança, promover uma correta avaliação do risco de tumorigênese (tumores gonadais, tumores renais) desses pacientes, e a expectativa de fertilidade e qualidade de vida, elementos que reforçam a necessidade da procura de novos métodos de investigação que apresentem maior efetividade no diagnóstico.

Na busca por um diagnóstico molecular para a grande proporção de pacientes portadores de DDS 46,XY e DDS 46,XX de etiologia não conhecida, novas técnicas de biologia molecular e citogenômica têm sido utilizadas mais recentemente. A investigação do exoma ou do genoma, usando as metodologias de sequenciamento de nova geração originam uma grande quantidade de informações em curto espaço de tempo, de forma rápida e eficiente, aumentando as possibilidades de novos diagnósticos. Essas técnicas estão se tornando realidade, na medida em que os seus custos são barateados, o que possibilita sua utilização não apenas em protocolos de pesquisa, mas também na prática clínica (ARBOLEDA; LEE; SANCHEZ; DELOT *et al.*, 2013; BAETENS; MLADENOV; DELLE CHIAIE; MENTEN *et al.*, 2014; BAXTER; ARBOLEDA; LEE; BARSEGHYAN *et al.*, 2015).

### **1.3 Citogenética clássica e citogenética molecular aplicadas no estudo das diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual**

O desenvolvimento da técnica de cariotipagem em 1956 revolucionou a citogenética, possibilitando a contagem dos 46 cromossomos humanos e a identificação das variantes cromossômicas numéricas patogênicas, determinantes de diferentes síndromes como síndrome de Down, Turner e Klinefelter; as duas últimas condições classificadas atualmente como DDS associados a anormalidades cromossômicas (GARTLER, 2006).

A utilização da cariotipagem e seu desenvolvimento nos anos subsequentes permitiu o desenvolvimento do cariótipo com Bandamento G, uma espécie de marcação cromossômica, que facilita a identificação de anormalidades estruturais como grandes deleções, inserções, translocações e outras formas complexas de rearranjos genômicos. Em vários pacientes com quadros sindrômicos e fenótipo de atipia genital e/ou malformações genitourinárias, diferentes tipos de aberrações cromossômicas estruturais foram identificados pelo estudo do cariótipo por técnicas

de citogenética convencional e bandamento, como síndrome da deleção do braço curto do cromossomo 9 (9p) e a síndrome da deleção do braço longo do cromossomo 10 (10q) (IRVING; HANSON; TURNPENNY; BREWER *et al.*, 2003; ONESIMO; ORTESCHI; SCALZONE; ROSSODIVITA *et al.*, 2012; QUINONEZ; PARK; RABAH; OWENS *et al.*, 2013; SHAPIRO; HANSEN; PASZTOR; DILIBERTI *et al.*, 1985).

Para o estudo de alterações submicroscópicas não identificáveis no cariótipo convencional, foram desenvolvidas técnicas de citogenética molecular, como o FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) e a técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). A técnica de FISH baseia-se no uso de sondas, isto é, sequências de DNA ligadas a fluorocromos que, por sua vez, se ligam a sequências de DNA que lhe são complementares. A pesquisa do gene *SRY* por técnica de FISH em pacientes com síndrome de Turner e DDS 46,XX testicular e ovariotesticular são ferramentas diagnósticas importantes e utilizadas na prática clínica em nosso Serviço.

A técnica de MLPA é utilizada para a detecção de deleções e/ou duplicações e baseia-se na hibridação simultânea e amplificação por reação em cadeia de polimerase de várias sondas diferentes em uma única reação, tornando-se uma alternativa mais rápida e econômica de estudo. *Kits* comerciais desenvolvidos para o estudo de genes envolvidos em anormalidades do desenvolvimento sexual (*NR5A1/SF1*, *SRY*, *DAX1*, *WNT4*, *DMRT1*, *SRD5A2*, *HSD3B2*, *entre outros*) estão disponíveis, o que possibilita a avaliação de pacientes com DDS por esta técnica.

Porém, ambos os métodos (FISH e MLPA) investigam um número limitado e específico de regiões do genoma, de forma que é necessária uma suspeita clínica para direcionar a pesquisa de uma região alvo específica. Nos casos em que o fenótipo clínico ou hormonal não sugerem um gene ou região cromossômica acometida essas técnicas se tornam ineficientes.

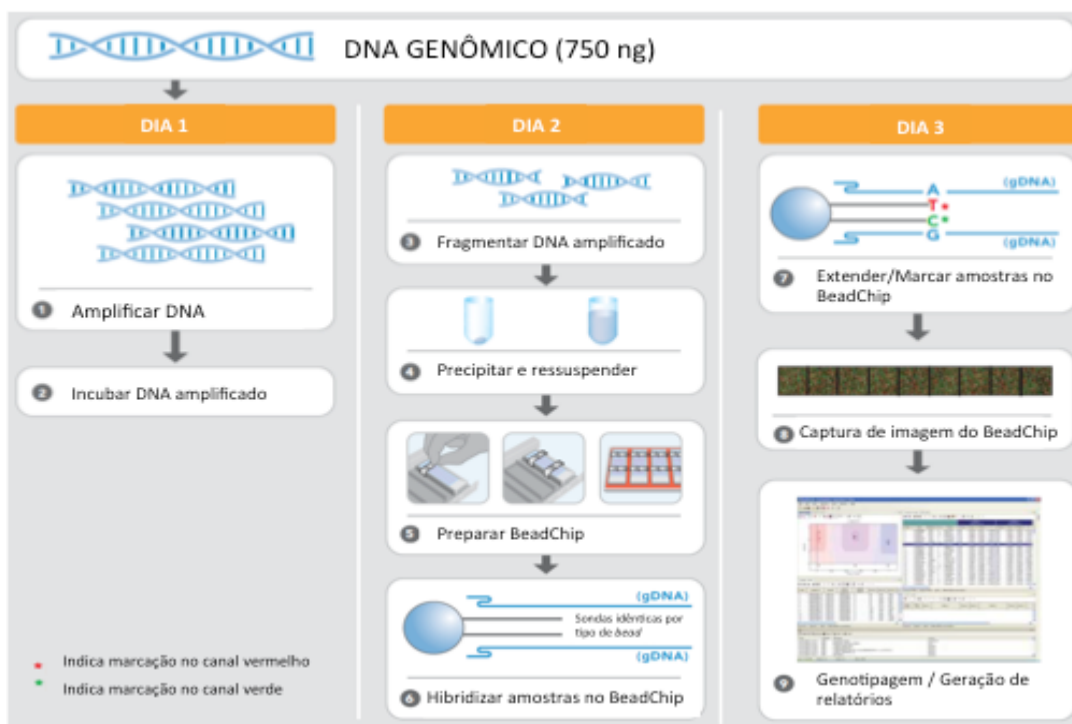
#### **1.4 Técnicas de *array* na investigação das diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual**

Recentemente, as técnicas de *arrays* têm sido aplicadas na pesquisa de alterações submicroscópicas em pacientes com DDS. Contínuos avanços nesse campo da ciência levaram ao desenvolvimento da técnica de *Comparative Genomic*

*Hybridization Array* (array-CGH) e *Single Nucleotide Polymorphism Array* (SNP-array), também conhecidos como “cariotipagem molecular” pela sua semelhança à técnica de cariotipagem, porém com uma resolução superior.

*Array-CGH* e *SNP-array* são técnicas de citogenômica que têm a capacidade de identificar alterações submicroscópicas no genoma, gerando dados sobre variação no número de cópias (CNVs) em todo o genoma, definidas como um seguimento genômico deletado ou duplicado com tamanho maior que 1 Kb. Além disso, as técnicas de citogenômica molecular são também capazes de detectar mosaicismos e perda de heterozigose (ACHERMANN; DOMENICE; BACHEGA; NISHI *et al.*, 2015; KULIKOWSKI).

O *array-CGH* baseia-se na marcação de quantidades equimolares de DNA de referência (controle) e DNA a ser estudado (teste) com dois diferentes fluoróforos. Posteriormente, são co-hibridados com ácidos nucléicos clonados de referência. A hibridação dos fluoróforos com as sequências de DNA teste e controle são comparadas a partir da intensidade da fluorescência gerada. O ganho de material genético é, portanto, expresso como aumento da fluorescência assim como a perda de material genético acarreta uma redução da fluorescência (BEJJANI; SHAFFER, 2006; WEISS; HERMSEN; MEIJER; VAN GRIEKEN *et al.*, 1999). Já a técnica de *SNP-array* dispensa a utilização de DNA de referência. Nesta técnica, o DNA teste é desnaturado e amplificado e após essa etapa procede-se a fragmentação enzimática do DNA e sua precipitação. O DNA fragmentado é aplicado ao *BeadChip* para hibridação. O DNA não hibridado será lavado, e adicionado fluorocromos ao *BeadChip*. A leitura da intensidade é realizada por *scanner* específico que permite a interpretação dos achados relativos a ganho ou perda de material genético (Figura 3).



**Figura 3 – Descrição das etapas da técnica de *bead array* da plataforma Illumina®.** Desenho experimental do *Beadarray*. Amostra de DNA é isotermicamente amplificada *overnight* (passo 1 e 2). O produto amplificado é então fragmentado por um processo enzimático controlado (passo 3), seguindo para os passos de precipitação alcoólica e ressuspensão do DNA (passo 4). O BeadChip, então, é preparado para a hibridação na câmara de fluxo por capilaridade (passo 5) e as amostras são aplicadas e incubadas *overnight*. As amostras de DNA, amplificadas e fragmentas, anelam a *locus* específicos de 50-mers durante o passo de hibridação (passo 6). Um tipo de *bead* corresponde a cada alelo por *locus* de SNP. Após a hibridação, o alelo específico é determinado por extensão enzimática de base com subsequente coloração fluorescente (passo 7). As intensidades da fluorescência das *beads* são detectadas pelo *scanner* (passo 8) e os dados são analisados por *softwares* específicos (passo 9) ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)).

Diversos autores tem demonstrado a importância dos métodos de *array* (SNP-*array* e *array*-CGH) como instrumento diagnóstico e investigativo dos pacientes com DDS cujo diagnóstico molecular ainda não foi estabelecido. A utilização das técnicas de *array* em coortes de pacientes com DDS 46,XY identificou anormalidades patogênicas em cerca de 20-33% dos casos estudados (ARBOLEDA; LEE; SANCHEZ; DELOT *et al.*, 2013; BAETENS; MLADENOV; DELLE CHIAIE; MENTEN *et al.*, 2014; CHAN; BUT; LEE; LAM *et al.*, 2015; HUTSON; GROVER; O'CONNELL; PENNELL, 2014; IGARASHI; DUNG; SUZUKI; IDA *et al.*, 2013; KON; FUKAMI, 2015; RICHARD; LEPRINCE; GRUCHY; PIGNY *et al.*, 2011; TANNOUR-LOUET; HAN; CORBETT; LOUET *et al.*, 2010). A presença de outras

malformações não genitais nos pacientes com DDS pode aumentar ainda mais a sensibilidade de detecção do método, pela possibilidade de representar uma maior perda genômica envolvida na fisiopatologia da doença em avaliação (LEDIG; HIORT; SCHERER; HOFFMANN *et al.*, 2010). A técnica de SNP-*array* também foi utilizada com sucesso por White e colaboradores na investigação de pacientes portadores de disgenesia gonadal 46,XY isolada e sindrômica (WHITE; OHNESORG; NOTINI; ROESZLER *et al.*, 2011).

Técnicas de *array* também têm sido utilizadas com sucesso na investigação de pacientes 46,XX com malformações dos derivados mullerianos (MCGOWAN; TYDEMAN; SHAPIRO; CRAIG *et al.*, 2015), assim como nos pacientes com diagnóstico de DDS 46,XX ovotesticular (MENGEN; KAYHAN; KOCAAY; UÇAKTÜRK, 2020). Novos genes candidatos, possivelmente envolvidos nos processos da determinação e diferenciação sexual, foram identificados nos estudos de pacientes com DDS, em especial pacientes com fenótipos sindrômicos, utilizando *arrays* (LEDIG; SCHIPPERT; STRICK; BECKMANN *et al.*, 2011; MCGOWAN; TYDEMAN; SHAPIRO; CRAIG *et al.*, 2015).

Baseados nesses achados, alguns autores têm proposto a técnica de *array* como a metodologia padrão-ouro na investigação de pacientes com DDSs sindrômicos (BAETENS; MLADENOV; DELLE CHIAIE; MENTEN *et al.*, 2014; NORLING; LINDEN HIRSCHBERG; IWARSSON; PERSSON *et al.*, 2013; TANNOUR-LOUET; HAN; CORBETT; LOUET *et al.*, 2010).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Primário:**

Estabelecer o diagnóstico molecular em pacientes com diferença/distúrbio do desenvolvimento sexual sindrômicos, cujo diagnóstico etiológico genético não é conhecido acompanhados no ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do HC/FMUSP utilizando a metodologia de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP-*array*).

### **2.2 Secundários:**

- Avaliar o papel da metodologia de SNP-*array* no diagnóstico de pacientes com DDS sindrômico;
- Avaliar a presença de deleções ou duplicações submicroscópicas em um grupo selecionado de pacientes portadores de DDS sindrômico;
- Identificar novas regiões cromossômicas e/ou novos genes possivelmente relacionados aos DDS 46,XY e 46,XX.

### 3. JUSTIFICATIVA

A maioria dos pacientes com diagnóstico de DDS sindrômico permanecem sem diagnóstico molecular estabelecido. O grande número de genes envolvidos na diferenciação e determinação sexual dificulta e encarece a busca de alterações gênicas, que correspondam aos fenótipos da apresentação clínica. As novas técnicas disponíveis, como o sequenciamento de alta performance e os *arrays*, permitem a avaliação do genoma de forma rápida e com maior eficácia do que o sequenciamento pelo método de Sanger “gene a gene” e a técnica de MLPA.

A relevância do estudo molecular dos pacientes portadores de DDS sindrômico está na possibilidade de se estabelecer um diagnóstico etiológico definitivo e rápido, que não somente auxilia na decisão sobre o sexo de criação naqueles nascidos com atipia genital e aconselhamento familiar, como também permite a orientação terapêutica mais adequada, informações de possíveis doenças associadas, que devem ser investigadas e acompanhadas (risco de tumores gonadais, outras malformações) e sobre o prognóstico de fertilidade.

A identificação de novas regiões cromossômicas e/ou novos genes possivelmente relacionadas aos DDS sindrômicos contribuirá de forma significativa no entendimento de novas vias envolvidas no desenvolvimento sexual.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Considerações éticas**

O estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki e pelos termos descritos pela Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisado Hospital das Clínicas da FMUSP sob o número CAAE: 60700616.9.0000.0068. Consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes ou pais/tutores antes que os procedimentos de pesquisas fossem iniciados (Anexo I).

### **4.2 Pacientes**

#### **4.2.1 Recrutamento e critérios de seleção dos pacientes**

O presente estudo selecionou pacientes acompanhados regularmente no Ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (Unidade A1MN 1003) da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os critérios de inclusão foram: (i) diagnóstico de DDS com genitália atípica ao nascimento, associados a outros fenótipos malformativos além do aparelho geniturinário; (ii) diagnóstico etiológico não estabelecido após estudo hormonal, ou por imagem anteriormente realizados; (iii) cariótipo disponível não conseguia explorar completamente o fenótipo encontrado.

#### **4.2.2 Obtenção de dados retrospectivos**

Para obtenção dos dados retrospectivos foi elaborado um protocolo para consulta dos prontuários (Anexo II).

Os dados de exame físico geral e exame da genitália externa no momento do início do acompanhamento na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - A1MN 1003 foram coletados das anotações dos prontuários, assim como os



resultados dos exames laboratoriais e hormonais realizados na investigação diagnóstica.

#### **4.2.3 Avaliação clínica, hormonal e de imagem**

Todos os pacientes selecionados foram submetidos a uma criteriosa avaliação clínica e, quando necessário, à complementação diagnóstica laboratorial e imaginológica. A pesquisa da presença de consanguinidade e de outros indivíduos afetados na família além do histórico relativo ao período pré-natal e neonatal foi realizada durante o interrogatório dos antecedentes familiares dos pacientes nas consultas médicas.

A classificação de prader e o escore de masculinização de genitália foram utilizados para descrever a genitália dos pacientes (Tabela 4) (AHMED, 2000; PRADER, 1989).

Além da reavaliação da genitália externa, das quais muitos pacientes já haviam sido submetidos a procedimentos cirúrgicos de correção da genitália atípica, o exame físico geral e dos diferentes aparelhos foi repetido conforme descrição abaixo:

1. avaliação antropométrica: avaliação do peso, altura e IMC;
2. exame dismorfológico: avaliação cuidadosa do paciente na busca ativa por sinais físicos de dismorfismos faciais e corpóreos, sugestivos de síndromes genéticas;
3. exame dos aparelhos: buscando malformações esqueléticas de coluna, tórax, pelve e extremidades, cardíacas, anormalidades oculares e/ou déficit visual; surdez associada ou não a outras alterações/malformações; nevus ou outras alterações de pele;
4. exame neurológico: avaliação da presença de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) ou retardo mental, déficits.

A avaliação hormonal dos pacientes foi realizada pelas dosagens basais de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona (T), seus precursores hormonais e diidrotestosterona (DHT) quando indicada. O teste de estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG) foi realizado nos indivíduos 46,XY na faixa etária pré-puberal, na dependência da disponibilidade da medicação.

Os exames de imagem previamente realizados foram revisados e complementados quando necessário. Exame de imagem do sistema nervoso central foi

solicitado nos pacientes com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) ou retardo mental. Ultrassonografia de rins e vias urinárias e Ecocardiografia foram realizados em todos os pacientes na busca de malformações orgânicas.

### 4.3 Material e métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP em colaboração com os Laboratórios de Medicina Laboratorial LIM/03 do HC-FMUSP (realização do *SNP-array* sob a supervisão da Profa. Dra. Leslie Kulikowski) e Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael/Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (realização do *SNP-array* sob supervisão do Dr. Bruno Solano).

#### 4.3.1 Extração do DNA genômico

As amostras de DNA dos pacientes selecionados e seus familiares foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico. O DNA foi extraído e armazenado de acordo com procedimento padronizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, baseado no método de Miller e colaboradores (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988).

A concentração do DNA foi estimada a partir da leitura da densidade óptica por espectrofotometria (Biophotometer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha); no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 µg/mL). O grau de pureza foi avaliado pela relação A260/280, sendo superior a 1,75. A integridade do material foi verificada com eletroforese em gel de agarose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 1% em TAE (Tris 0,004 M; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,001 M pH 8,0) contendo *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) na concentração de 0,1 µL/mL de gel com posterior visualização por transiluminação com luz ultravioleta para verificar sua integridade. Foram utilizados 500 ng do marcador de peso molecular  $\lambda$  *DNA-HindIII digest* (250

ng/WL) e 20 ng do  $\lambda$  DNA (10 ng/WL) (ambos *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EUA) como padrão de massa. Em seguida, as amostras foram mantidas congeladas a menos 20° C até seu uso.

#### 4.3.2 Polimorfismo de único nucleotídeo *array* (SNP-*array*): *Infinium* CytoSNP-850K *BeadChip*<sup>®</sup> da plataforma Illumina<sup>®</sup>.

O *Infinium* CytoSNP-850K *BeadChip*<sup>®</sup> da plataforma Illumina<sup>®</sup> compreende um painel de triagem do genoma contendo aproximadamente 850.000 sondas de oligonucleotídeos de 50-mers, com um espaçamento médio de 1,8 kb entre elas, sendo capaz de identificar SNPs. Estas sondas abrangem todo o genoma e são consideradas sondas alvo para todas as regiões de importância citogenética conhecidas, incluindo regiões subteloméricas, pericentroméricas e dos cromossomos sexuais.

Para a realização do experimento foram utilizados 4  $\mu$ L de DNA a uma concentração final de 50 ng/ $\mu$ L. As amostras extraídas foram transferidas para uma placa MAS3 específica para que o DNA fosse denaturado quimicamente e neutralizado por reagentes específicos fornecidos no *kit*. Em seguida, foi realizada a etapa de amplificação genômica, na qual as amostras foram incubadas a 37°C por 20-24 horas.

Após a amplificação genômica, o DNA primeiramente foi fragmentado por ação enzimática (reagente FMS) e, posteriormente, precipitado usando 2-propanol e PM1 como reagentes da reação. A placa com as amostras foi mantida invertida por pelo menos 1 hora a temperatura ambiente para que o *pellet* possa secar. Em seguida, o DNA precipitado foi ressuspensionado em um reagente denominado RA1 e aplicado no *BeadChip*. Este produto foi incubado a 48°C por aproximadamente 16 horas para que ocorresse a hibridação das amostras nas sondas específicas.

Terminada a etapa da hibridação, o DNA não hibridado ao *BeadChip* foi removido por lavagem. O *BeadChip* lavado foi preparado para o processo de coloração com a adição de nucleotídeos marcados com fluorocromos específicos. Nesta etapa o DNA não hibridado foi removido e os nucleotídeos (A, T, C e G) adicionados, seguindo para a etapa de coloração dos nucleotídeos hibridados com fluorocromos específicos (A e T – marcação em vermelho; C e G – marcação em verde).

Após a lavagem, a intensidade dos sinais foi medida por um *laser scanner*, o *iScan System*<sup>®</sup> (*Illumina technology*), e a análise foi realizada com o auxílio de *softwares* específicos disponibilizados pelo fabricante, como o *BlueFuse Multi 4.3*<sup>®</sup> (*BlueGnome*<sup>®</sup>, Illumina, Washington, DC, EUA). Nenhum filtro para análise das CNVs (deleções ou duplicações) foi aplicado antes da análise. Apenas são consideradas deleções ou duplicações reais pelo método, aquelas que comprometem a hibridação consecutiva de pelo menos 10 sondas.

Os resultados obtidos foram comparados com bancos de dados já existentes como: UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hg>); Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>) e DECIPHER Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensemble Resources (<http://decipher.sanger.ac.uk/>).

Técnicas complementares como MLPA, FISH e sequenciamento por técnica de Sanger ou por painel customizado de genes para DDS foram, em alguns casos, utilizadas para complementação diagnóstica.

### **4.3.3 Polimorfismo de único nucleotídeo *array* (SNP-*array*): CytoScan HD 750K da Affymetrics**

A técnica de *array* da plataforma affymetrics Scan HD 750K possui sondas formadas por curtas sequências de oligonucleotídeos de 25-mer. Nessa plataforma foram utilizados o chip CytoScan HD que possuía 2.696.550 de sondas de CNVs e 749.157 de SNPs, com uma cobertura média de sonda de 1,1 Kb. Esta técnica foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Para a realização dos experimentos foram utilizadas duas alíquotas (etapa Sty e etapa Nsp) de 5 µL de DNA de cada amostra a uma concentração final de DNA de 50 ng/µL.

Na realização da etapa foram adicionados 14,75 µL da enzima NspI ao DNA genômico para digestão, sendo então incubadas a 37°C durante 2 horas, 65°C durante 20 minutos e mantidas a 4°C. Adicionamos posteriormente 5,25 µL do Mix de DNA ligase com NspI adaptador para a etapa de ligação de um adaptador e as amostras foram incubadas novamente a 16°C durante 3 horas, 70°C por 20 minutos e mantidas a 4°C. As amostras foram divididas em três placas de PCR (10 µL por placa) e foi

adicionado 90  $\mu\text{L}$  do PCR Master Mix em cada uma delas, sendo transferidas ao termociclador com o seguinte programa: 1 ciclo a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos a 94°C, 60°C e 68°C por 30, 45 e 15 segundos, 1 ciclo a 68°C por 7 minutos e mantidas no gelo.

No dia seguinte, foram repetidos as etapas descritas acima para o Nsp. Foi utilizado o Nsp I Digestion Master Mix, o Nsp I Ligation Master Mix e o Nsp PCR Master Mix com a diferença que para a etapa de PCR, as amostras foram divididas em quatro placas. Os produtos amplificados (Sty e Nsp) foram purificados por precipitação por isopropanol e os produtos de PCR foram quantificados e diluídos. Em todas as amostras foram adicionados os reagentes de fragmentação e estas foram incubadas a 37°C por 35 minutos, 95°C por 15 minutos e mantidas a 4°C, sendo que para confirmação da fragmentação das amostras foi corrido um gel de agarose a 2%.

Terminada a fragmentação, as amostras foram mantidas no gelo e foram adicionados 89  $\mu\text{L}$  do Labeling Master Mix em cada uma delas para a marcação do DNA. As amostras foram novamente incubadas a 37°C por 4 horas, 95°C por 15 minutos e mantidas no gelo.

Após esta etapa, foi preparado o Hybridization Master Mix e este foi adicionado na amostra, para que ocorresse a hibridação destas no chip, sendo que nesta etapa o DNA é denaturado novamente a 95°C por 10 minutos e as amostras são mantidas a 49°C. As amostras foram aplicadas nos *chips* e estes, então, foram colocados no forno de hibridação com uma rotação de 60 rpm e temperatura de 50°C, e as amostras ficaram hibridando por 16 a 18 horas.

Terminada a hibridação, os *chips* foram lavados e corados (streptavidin phycoerythrin – SAPE / anti-streptavidin biotinylated antibody stain / SAPE) por 3 horas. Finalmente, os *chips* foram escaneados no Genechip scanner, os dados foram extraídos pelo Genotyping console software v3.0.2 e os resultados analisados no Chromosome Analysis Suite (Chas), sendo a intensidade do sinal proporcional ao número de cópias genômicas da região analisada. Filtros para análise necessitaram ser estabelecidos. Para deleção, foram reportadas aquelas que possuíam tamanho maior que 5Kb e envolviam a não hibridação de pelo menos 20 marcadores; já para as duplicações, foram reportadas aquelas com tamanho maiores que 5Kb, porém com mais de 50 marcadores não hibridados.

#### 4.4 Análise *in silico* dos resultados do SNP-array

As coordenadas genômicas das CNVs resultantes da análise de SNP-array (Illumina SNP array 850K e affymetrics CytoScan HD 750K) estão em acordo com o *Human Genome Building* GRCh37/hg19 (*Genome Reference Consortium human genome*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/>).

A análise das alterações encontradas foi baseada nas seguintes premissas: 1. Exclusão das CNVs caracterizadas como polimórficas; 2. Avaliação da patogenicidade da CNV encontrada.

Para realizar a exclusão das CNVs polimórficas, foi comparada a CNV encontrada em nossos pacientes com CNV descritas na literatura médica em indivíduos saudáveis. Para tal foi utilizado o banco de dados compilados no *Database of Genomic Variants* (DGV) (<http://projects.tcag.ca/variation>), o maior banco de dados de CNVs em indivíduos saudáveis disponível. A presença de sobreposição entre a CNV encontrada no paciente com CNVs em indivíduos saudáveis na plataforma do DGV assim como a incidência polimórfica da alteração (presente em mais de 1% dos indivíduos analisados pelas técnicas de *array*) predizia a benignidade das alterações, e portanto não foram avaliadas pelas etapas subsequentes.

Afim de avaliar a patogenicidade das CNVs encontradas, após a exclusão das variantes polimórficas, diversos fatores foram levados em consideração, seguindo os critérios de patogenicidade do Colégio Americano de Genética Médica (ACMG) publicado em 2011 (KEARNEY; THORLAND; BROWN; QUINTERO-RIVERA *et al.*, 2011) (Tabela 3). As seguintes características das CNVs foram avaliadas a fim de estabelecer a patogenicidade:

- a) Ausência da CNV em banco de dados de indivíduos saudáveis/controles;
- b) Sobreposição da CNV encontrada com síndromes de microdeleção e/ou microduplicação bem estabelecidas na literatura médica;
- c) Tamanho da CNV encontrada;
- d) Região da CNV rica em genes causadores de doenças em humanos;
- e) Região da CNV com presença de genes que sofram haploinsuficiência ou dose dependência;
- f) Herança genética da CNV (herdada ou *de novo*).

Para tal foram utilizados os seguintes bancos de dados: DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*; <http://decipher.sanger.ac.uk/>) e ISCA (The International Standard Cytogenomic Array; <https://www.iscaconsortium.org/>); CLINVAR (Clinically relevant Variants <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>); UCSC (*University of California, Santa Cruz Genome Browser*; <http://genome.ucsc.edu/>); OMIM (Online Mendelian Inheritance for Man; <https://www.omim.org>) e PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Plataformas disponíveis na *web* que auxiliam na interpretação das CNVs compilando informações dos diversos *sites* referidos anteriormente como o Scripps Genome ADVISER CNV <http://genomics.scripps.edu/ADVISER/> também foram utilizadas para auxiliar na interpretação dos achados.

O conteúdo gênico da CNV de interesse clínico foi avaliado quando a probabilidade de ser não tolerante a perda de função do gene (pLi), sugerindo haploinsuficiência do gene avaliado na região (HAN, 2018). Quanto mais próximo a 1, maior a chance do gene avaliado sofrer interferência pela haploinsuficiência encontrada.

Recentemente, foi publicado pelo ACMG e pelo Clinical Genomic Resource (ClinGen) uma atualização para a avaliação das CNVs (RIGGS; ANDERSEN; CHERRY; KANTARCI *et al.*, 2020). Essa atualização propõe uma avaliação semiquantitativa dos critérios de patogenicidade, a fim de promover consistência e reprodutibilidade nas avaliações das CNVs.

**Tabela 3 - Critérios utilizados para a classificação das CNVs de acordo com sua patogenicidade**

<b>Critérios principais</b>	<b>CNVs patogênicas</b>	<b>CNVs benignas</b>
Alteração sobreposta às regiões descritas em indivíduos saudáveis ou polimórficas (por exemplo, DGV)		X
Alteração sobreposta às regiões com duplicações e deleções reportadas em pacientes com fenótipos alterados (por exemplo, DECIPHER)	X	
CNV contém gene(s) OMIM ou já relacionados a doenças previamente (PubMed)	X	
CNV rica em genes	X	
CNV pobre em genes		X

<b>Crítérios Secundários</b>	CNVs patogênicas	CNVs benignas
CNV é uma deleção	X	
CNV é uma duplicação		X
CNV é uma amplificação (ganho de mais de uma cópia)	X	
CNV de tamanho > 3 Mb	X	
CNV não tem genes e é desprovida de elementos regulatórios conhecidos		X

DGV: Database of Genomic Variants, DECIPHER: *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*, OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. (adaptada de Lee *et al*)

De acordo com a estratégia descrita acima, as deleções e duplicações encontradas nos pacientes selecionados foram categorizadas como patogênicas, quando sobrepostas a outras CNVs relatadas na literatura conhecidamente relacionados à doença em humanos. Essas CNVs preencheram a maioria dos critérios de patogenicidade do ACMG e possuíam pontuação maior ou igual a 0,99 pelo critério semiquantitativo. As CNVs foram classificadas como provavelmente patogênicas, quando ocorriam em região genômica contendo gene(s) associados ao fenótipo apresentado pelo paciente, era rara e não polimórfica, porém sem uma síndrome bem estabelecida causada por CNVs naquela região cromossômica e com pontuação entre 0,90 e 0,98 pelo critério semiquantitativo. As CNVs foram categorizadas como benignas ou provavelmente benignas quando nenhum dos critérios de patogenicidade foi atendido, associado a uma característica polimórfica ou presente em indivíduos saudáveis nos bancos de dados e possuíam pontuação menor ou igual a -0,90 pelo critério semiquantitativo. Por fim, as CNVs foram classificadas como variantes de significado clínico incerto (VUS), quando foram incapazes de serem classificadas em uma das outras três categorias mencionadas acima e possuíam pontuação entre -0,89 a 0,89 pelo critério semiquantitativo. O padrão de herança (*de novo* ou herdadas) das CNVs foi avaliada naqueles indivíduos com CNVs patogênicas ou provavelmente patogênicas e com DNA dos pais disponível para análise.



## 5. RESULTADOS

Vinte e dois pacientes com DDS associados a outros fenótipos malformativos foram avaliados utilizando a técnica de microarray (SNP-*array*). A descrição das características fenotípicas da amostra de pacientes incluídos encontra-se na Tabela 4.

Oito pacientes foram recém-nascidos prematuros ou pequenos para idade gestacional (PIG). Cinco pacientes apresentaram malformações anorretais, sete cardiopatia congênita, dois desses com necessidade de correção cirúrgica. Malformações renais e anatômicas do SNC estavam presentes em três pacientes cada uma; e dois pacientes eram obesos. Atraso no DNPM em graus variados, assim como malformações de extremidades foram observadas em todos os pacientes.

Após a realização de cariótipo com bandeamento G (mínimo de 20 células analisadas), dezesseis pacientes foram classificados como DDS 46,XY, cinco pacientes como DDS 46,XX, e um paciente com DDS cromossômico e cariótipo 47,XYY. Alterações identificadas ao cariótipo em autossomos estavam presentes em três dos pacientes com DDS 46,XY: paciente número 7 com cariótipo 46,XY del 10q; paciente número 13 com cariótipo 46,XY del 1q; e paciente número 14 com translocação balanceada e cariótipo 46,XY, t(3;9).

Tabela 4 - Classificação do DDS, características clínicas e da genitalia externa dos participantes do estudo.

Identificação do participante	Classificação do DDS	Malformações associadas	Atipia genital	*EMS / **Prader	Derivados Mullerianos
1	DDS 46,XX	Dismorfismo facial, ADNPM, cardiopatia congênita, malformações em extremidades	Clitoromegalia, fusão parcial grandes lábios	0 / II	+
2	DDS 46,XX testicular	Dismorfismo facial, ADNPM, cardiopatia congênita, malformações em extremidades	Masculina típica	12 / V	-
3	DDS 46,XX ovário-testicular	Dismorfismo facial, ADNPM, malformações em extremidades	Clitoromegalia, orifício único perineal, gônada palpável inguinal	2.5 / III	+
4	DDS 46,XX	Dismorfismo facial, ADNPM, cardiopatia congênita, MR, malformações em extremidades	Hipospádia proximal, bolsa bífida, criptorquidia bilateral	2.5 / IV	-
5	DDS 46,XX	Dismorfismo facial, ADNPM, malformação em SNC, convulsão, Hipoacusia, amaurose bilateral, Hipogonadismo hipogonadotrófico, malformações em extremidades, Obesidade	Clitoromegalia, Fusão parcial dos grandes lábios, orifício perineal único, gônadas não palpadas	2.5 / III	-
6	DDS 46,XY	Catarata congênita, ADNPM, malformações em extremidades	Micropênis, hipospádia distal, criptorquidia bilateral	5.5	-
7	DDS 46,XY del 10q	Dismorfismo facial, ADNPM, hipoacusia, PIG, cardiopatia congênita, MAR, malformações em extremidades	Hipospádia proximal, criptorquidia bilateral	5.0	-

Identificação do participante	Classificação do DDS	Malformações associadas	Atipia genital	*EMS / **Prader	Derivados Mullerianos
8	DDS 46,XY	Dismorfismo facial, ADNPM, malformação em extremidades	Micropênis, hipospádia	8.0	-
9	DDS 46,XY	Dismorfismo facial, ADNPM, Convulsão, MAR, obesidade, malformações em extremidades	Agenesia de fálus	9.0	-
10	DDS 46,XY	Dismorfismo facial, ADNPM, prematuro, MR, malformação parede abdominal, MAR, malformações em extremidades	Hemifálus, criptorquidia bilateral	1.0	-
11	DDS 46,XY	Dismorfismo facial, ADNPM, FIG, Prematuro, malformações em extremidades	Micropênis, hipospádia, criptorquidia bilateral	3.0	-
12	DDS 46,XY	Dismorfismo facial, ADNPM, cardiopatia congênita, FIG, malformações em extremidades, Frouxidão ligamentar	Criptorquidia bilateral, Hipospádia	9.0	-
13	DDS 46,XY del 1q	Dismorfismo facial, ADNPM, malformações em extremidades, Prematuro	Hipospádia, criptorquidia bilateral	8.0	-
14	DDS 46,XY, t(3;9)	Dismorfismo facial, ADNPM, FIG, cardiopatia congênita, malformações em extremidades	Hipospádia, criptorquidia bilateral	9.0	-
15	DDS 46,XY	Dismorfismo facial, ADNPM, malformação SNC, Malformação em extremidades	Hipospádia, Criptorquidia	9.5	-
16	DDS 47,XY	Dismorfismo facial, ADNPM, malformação torácica, malformações em extremidades	Clitoris normal, fusão parcial dos grandes lábios, dois orifícios perineais, gônadas não palpadas	2.5	-

Identificação do participante	Classificação do DDS	Malformações associadas	Atipia genital	*EMS / **Prader	Derivados Mullerianos
17	DDS 46,XY	Dismorfismo facial, craniosinostose, ADNPM, prematuridade, insuficiência adrenal primária	Pênis curvo, Criptorquidia bilateral	11	-
18	DDS 46,XY	Dismorfismo facial, ADNPM, prematuro, cardiopatia congênita	Transposição peno escrotal, Hipospadia proximal	10	-
19	DDS 46,XY	Dismorfismo facial, ADNPM	Micropenis, transposiçãoo penoescrotal, hipospadia proximal, criptorquidia unilateral	6.5	-
20	DDS 46,XY	Dismorfismo facial, ADNPM, MAR, malformação em extremidades	Hipospadia proximal	10	-
21	DDS 46,XY	Dismorfismo facial, ADNPM, malformação em SNC, Obesidade	Criptorquidia bilateral	10.5	-
22	DDS 46,XY r(13)	Dismorfismo facial, ADNPM, microcefalia, PIG, MAR, MR	Hipospadia, criptorquidia bilateral	8.5	-

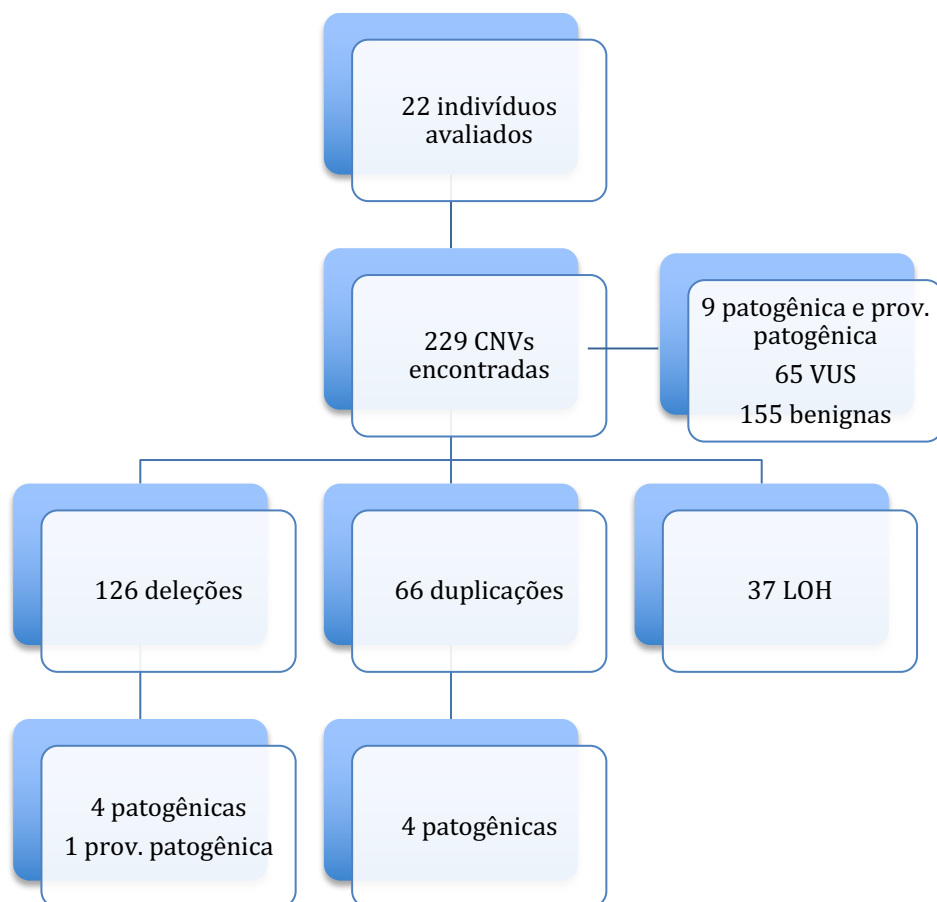
DDS: diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual; ADNPM: atraso do desenvolvimento neuropsicomotor; SNC: sistema nervoso central; MAR: malformação anorretal. PIG: pequeno para idade gestacional; MR: malformação renal; EMS: escore de masculinização genital; +: presente; -: ausente

### *Resultados dos arrays*

Um total de 229 CNVs foram identificadas nos 22 pacientes estudados, perfazendo uma média de 10,4 CNVs por paciente (Figura 4). O paciente com menor número de CNVs apresentou apenas uma CNV enquanto o paciente com o maior número de CNVs apresentou 34. O tamanho das CNVs encontradas variou de 2,8Kb a 44,5Mb. Foram também identificadas 37 regiões com perda de heterozigose (LOH) no genoma de seis pacientes. Dois deles (paciente 12 e 16) concentraram 31 das 37 regiões com perda de heterozigose, ambos com história de consanguinidade entre os genitores.

Das 229 CNVs encontradas, 126 eram deleções, 66 duplicações e 37 LOH. Após análise criteriosa, apenas nove CNVs em seis pacientes foram consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas. Sessenta e cinco CNVs foram consideradas VUS, e as restantes 155 foram classificadas como benignas. A maioria das CNVs portanto foi considerada benigna ou variante de significado incerto.

A seguir serão detalhados os resultados dos *arrays* em pacientes nos quais CNVs categorizadas como patogênicas foram identificadas (Tabelas 5 e 6).



**Figura 4. Fluxograma das CNVs obtidas a partir da avaliação dos participantes por SNP-array.**

**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
1	9 CNVs; 3 dup, 5 del, 1 LOH	del (x1)	1p21.1	50,832	106,164,198	106,215,029	Benigna
		del (x1)	1q31.3	109,088	196,716,541	196,825,628	VUS
		dup (x3)	2p16.3	56,752	52,030,134	52,086,885	Benigna
		del (x1)	5p15.2	31,341	9,902,403	9,933,742	Benigna
		dup (x3)	5q23.2	48,552	123,009,413	123,057,964	Benigna
		del (x1)	6p21.33	2,831	31,338,528	31,341,357	Benigna
		del (x1)	7q34	41,979	142,430,044	142,472,022	Benigna
		dup (x3)	12p13.31	97,569	8,003,758	8,101,326	Benigna
		LOH	Xp11.21-q12	11,020,888	55,982,443	67,003,330	VUS
2	11 CNVs; 2 dup, 9 del	del (x1)	3q29	1,735,367	195,677,895	197,413,261	Patogênica
		del (x1)	4q22.3-q23	390,823	98,575,319	98,966,141	Benigna
		del (x1)	7p14.1	7,82	38,300,919	38,308,738	Benigna
		del (x1)	7p14.1	39,221	38,341,226	38,380,446	Benigna
		del (x1)	7q34	170,959	142,328,771	142,499,729	VUS
		del (x1)	12q23.1	119,243	99,643,543	99,762,785	VUS
		del (x1)	12q24.33	94,391	131,730,735	131,825,125	Benigna

**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
		del (x1)	14q11.2	5,465	22,915,816	22,921,280	Benigna
		del (x1)	Xp22.33	826,442	2,697,868	3,524,309	VUS
		dup (x3)	Xq21.31	1,339,810	88,889,091	90,228,900	VUS
		dup (x3)	Xq21.31-q21.32	571,211	91,601,729	92,172,939	Benigna
		dup (x3)	1p36.22	61,229	9,321,241	9,382,469	VUS
		del (x1)	1q23.3	136,024	161,511,911	161,647,934	Benigna
		del (x1)	3q26.1	141,605	167,207,837	167,349,441	VUS
<b>3</b>	8 CNVs; 3 dup, 5 del	del (x1)	7p14.1	64,661	38,292,663	38,357,323	Benigna
		del (x1)	7q34	106,908	142,430,044	142,536,951	Benigna
		dup (x3)	13q12.11	234,582	20,224,387	20,458,968	Benigna
		del (x1)	19q13.31	116,061	43,647,130	43,763,190	Benigna
		dup (x3)	19q13.42	30,155	53,961,989	53,992,143	Benigna
		dup (x3)	1p21.1	18,897	104,109,722	104,128,618	Benigna
<b>4</b>	11 CNVs; 4 dup, 6 del, 1 LOH	del (x1)	3p11.1	109,246	89,493,167	89,602,412	VUS
		dup (x3)	4q12	16,965	58,081,590	58,098,554	Benigna
		del (x1)	6p21.33	93,386	31,360,255	31,453,640	Benigna
		del (x1)	7p21.2	64,099	14,987,656	15,051,754	Benigna



**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
		dup (x3)	7q11.21	114,567	62,167,336	62,281,902	Benigna
		del (x1)	11p15.1	26,76	21,189,086	21,215,845	Benigna
		del (x1)	13q31.1	54,221	84,103,707	84,157,927	Benigna
		del (x1)	19p12	89,05	20,626,179	20,715,228	Benigna
		dup (x3)	Xq21.33	1,559,583	93,857,455	95,417,037	VUS
		LOH	11p11.2-q11	7,840,623	47,372,087	51,591,253	VUS
5	7 CNVs; 3 del, 4 dup	del (x1)	7p14.1	109,425	38,295,996	38,405,421	Benigna
		del (x1)	8p11.22	162,584	39,226,335	39,388,919	Benigna
		dup (x3)	10q11.21	254,359	42,831,201	43,085,560	Benigna
		dup (x3)	10q11.22	1,245,092	46,975,076	48,220,168	Benigna
		dup (x3)	15q15.3	119,331	43,888,206	44,007,537	Benigna
		del (x1)	Xp22.33	9,031,430	2,693,466	11,724,896	Patogênica
		dup (x1)	Yp11.31	7,118,436	2,650,424	9,768,860	Patogênica
		del (x1)	1q21.3	7,883	154,943,881	154,951,763	VUS
		del (x1)	3p14.2	63,385	60,746,530	60,809,914	Benigna
		del (x1)	6p22.1	17,199	30,229,306	30,246,504	Benigna
6	8 CNVs; 8 del	del (x1)	9q22.33	128,166	100,943,397	101,071,562	VUS
		del (x1)	10q24.32	12,043	103,988,265	104,000,307	Patogênica
		del (x1)	14q24.2	196,668	73,086,151	73,282,818	VUS
		del (x1)	15q22.33	52,216	67,322,068	67,374,283	VUS
		del (x1)	15q26.3	41,468	99,207,345	99,248,812	VUS
7	9 CNVs;	dup (x3)	2p16.1	42,832	57,402,640	57,445,471	Benigna

**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
	5 dup, 4 del	del (x1)	2q37.3	100,776	242,947,985	243,048,760	Benigna
		del (x1)	3p26.1	142,421	4,110,799	4,253,219	Benigna
		del (x1)	7p12.1	124,507	53,465,744	53,590,250	Benigna
		dup (x3)	8p21.3	187,278	22,147,333	22,334,610	VUS
		del (x1)	10q25.3-q26.2	11,666,415	118,087,298	129,753,712	Patogenico
		dup (x3)	12p11.21	113,361	31,296,219	31,409,579	Benigna
		dup (x3)	14q11.2	35,135	21,358,155	21,393,289	Benigna
		dup (x3)	17q25.3	24,304	77,367,698	77,392,001	Benigna
<b>8</b>	4 CNVs; 2 dup, 2 del	del (x1)	1q31.3	78,454	196,823,300	196,901,753	Benigna
		del (x1)	12q14.1	34,807	58,110,211	58,145,017	VUS
		dup (x3)	15q21.3	147,231	57,644,533	57,791,763	Benigna
		dup (x3)	19p13.12	50,853	15,780,017	15,830,869	Benigna
<b>9</b>	3 CNVs; 1 dup, 2 del	dup (x3)	6q12	175,385	64,616,024	64,791,408	Benigna
		del (x1)	20q13.13	277,3	47,797,653	48,074,952	VUS
		del (x0)	Xq25	186,401	125,098,776	125,285,176	Benigna
<b>10</b>	9 CNVs; 4 dup, 3 del, 2 LOH	dup (x3)	2p22.3	697,651	32,633,569	33,331,219	Benigna
		del (x1)	7p14.1	50,423	38,292,663	38,343,085	Benigna

**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
		dup (x3)	7p12.3	32,51	47,991,245	48,023,754	Benigna
		del (x1)	14q11.2	122,013	22,791,563	22,913,575	Benigna
		del (x1)	19q13.31	64,32	44,874,369	44,938,688	Benigna
		dup (x2)	Xq24	20,384	116,869,914	116,890,297	Benigna
		dup (x2)	Xq28	67,883	148,734,633	148,802,515	Benigna
		LOH	1q25.1-q25.3	6,931,601	175,374,390	182,305,990	Benigna
		LOH	2p12-q11.2	21,751,720	79,641,996	101,393,715	Benigna
<b>11</b>	13 CNVs; 5 dup, 8 del	dup (x3)	1q44	859,521	247,828,797	248,688,317	Benigna
		dup (x3)	3p25.2	96,358	12,631,605	12,727,962	Benigna
		dup (x3)	3q23	80,299	142,210,192	142,290,490	Benigna
		del (x1)	6q26	26,819	162,993,672	163,020,490	Benigna
		del (x1)	13q31.1	54,221	84,103,707	84,157,927	Benigna
		del (x1)	14q11.2	62,859	21,359,808	21,422,666	Benigna
		del (x1)	14q11.2	50,357	21,359,808	21,422,666	Benigna
		del (x1)	16q23.2	90,657	80,491,318	80,581,974	VUS
		del (x1)	17q21.31	4,228	43,998,328	44,002,555	VUS
		del (x1)	19q13.2	33,106	41,973,609	42,006,714	Benigna

**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
12	16 CNVs: 2 dup, 14 LOH	dup (x3)	19q13.33	107,055	50,486,939	50,593,993	Benigna
		dup (x3)	21q22.3	30,556	43,538,093	43,568,648	VUS
		dup (x3)	8p23.1	42,651	8,101,641	8,144,291	Benigna
		dup (x3)	10q26.3	126,747	135,351,137	135,477,883	VUS
		LOH	1p31.3-p22.3	20,243,253	65,148,312	85,391,564	Benigna
		LOH	2p24.1-p22.3	14,258,850	20,719,131	34,977,980	Benigna
		LOH	3p11.1-q13.12	18,414,533	88,859,724	107,274,256	Benigna
		LOH	4p12-q13.2	23,538,747	45,896,156	69,434,902	Benigna
		LOH	4q24-q28.3	30,398,259	103,121,043	133,519,301	Benigna
		LOH	5p13.3-q13.3	43,796,698	31,993,822	75,790,519	Benigna
		LOH	5q34-q35.2	12,272,708	162,737,689	175,010,396	Benigna
		LOH	6p25.3-p25.1	4,442,767	108,666	4,551,432	Benigna
		LOH	12q13.12-q21.1	21,360,478	50,326,176	71,686,653	Benigna

**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
		LOH	13q14.11-q14.13	3,533,171	43,754,772	47,287,942	Benigna
		LOH	13q22.3-q31.3	16,011,481	78,034,564	94,046,044	Benigna
		LOH	17q12-q25.3	41,172,484	36,495,096	77,667,579	Benigna
		LOH	20p12.2-q13.12	32,413,691	10,081,800	42,495,490	Benigna
		LOH	22q11.1-q11.23	9,544,282	16,114,244	25,658,525	Benigna
		del (x1)	1q21.2	544,654	148,823,793	149,368,446	Benigna
		del (x1)	2p11.2	787,506	89,452,968	90,240,473	Benigna
		del (x1)	2q37.3	111,84	242,917,734	243,029,573	Benigna
<b>13</b>	9 CNVs; 2 dup, 5 del, 2 LOH	LOH	3p11.1	5,453,336	88,377,271	93,830,606	VUS
		dup (x3)	4p15.1	430,186	31,641,279	32,071,464	Benigna
		dup (x3)	7p22.3	41,144	46,239	87,382	Benigna
		del (x1)	14q32.2	135,211	98,852,082	98,987,292	Benigna
		del (x1)	15q11.2	855,624	21,903,815	22,759,438	Benigna
		LOH	16p11.2-q12.1	16,591,589	31,464,296	48,055,884	VUS
<b>14</b>	24 CNVs;	del (x1)	1p31.1	74,82	84,615,595	84,690,414	Benigna

**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
	2 dup, 22 del	del (x1)	3q13.31	38,936	114,718,210	114,757,145	VUS
		del (x1)	4p15.31	48,359	17,846,522	17,894,880	VUS
		dup (x3)	4q12	43,295	58,055,260	58,098,554	Benigna
		del (x1)	4q21.3	6,923	87,130,227	87,137,149	Benigna
		del (x1)	5p13.2	10,066	36,883,707	36,893,772	VUS
		del (x1)	5p13.2	21,153	36,988,613	37,009,765	VUS
		del (x1)	6p22.1	12,402	29,341,007	29,353,408	Benigna
		del (x1)	6p21.1	16,311	45,302,654	45,318,963	Benigna
		del (x1)	7p21.3	49,982	8,800,804	8,850,785	Benigna
		del (x1)	7p14.1	47,625	38,297,145	38,344,769	Benigna
		del (x1)	8q24.23	174,844	137,682,484	137,857,327	Benigna
		del (x1)	9p24.1	82,008	4,999,773	5,081,780	VUS
		del (x1)	10q23.31	11,209	89,634,265	89,645,473	Benigna
		del (x1)	10q24.2	89,599	100,818,115	100,907,713	Benigna
		del (x1)	11p15.2	5,224	16,148,559	16,153,782	Benigna
		del (x1)	11q22.3	133,649	103,021,106	103,154,754	Benigna
		del (x1)	12p12.1	9,123	24,362,981	24,372,103	VUS
		del (x1)	12q12	106,099	39,947,325	40,053,423	Benigna
		del (x1)	12q23.3	11,271	103,989,950	104,001,220	VUS
		del (x1)	13q31.3	13,286	92,733,829	92,747,114	Benigna

**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
		del (x1)	17q11.2	33,587	29,526,346	29,559,932	VUS
		dup (x3)	17q21.31	414,334	44,165,803	44,580,136	VUS
		del (x1)	20q13.12	43,554	44,336,716	44,380,269	Benigna
		del (x1)	1q21.3	5,641	154,943,881	154,949,521	VUS
		del (x1)	2p11.2	130,177	85,492,141	85,622,317	VUS
		del (x1)	6p25.2	29,48	2,437,996	2,467,475	Benigna
		dup (x3)	6p21.31	29,522	35,512,955	35,542,476	Benigna
		del (x1)	9q34.11	12,021	130,601,841	130,613,861	VUS
		del (x1)	12q13.3	124,867	56,625,045	56,749,911	VUS
		del (x1)	13q31.3	7,204	93,011,746	93,018,949	Benigna
<b>15</b>	15 CNVs; 5 dup, 10 del	dup (x3)	14q11.2-q12	6,589,078	19,280,733	25,869,811	Patogênica
		dup (x3)	14q32.33	227,348	106,603,101	106,830,448	Benigna
		del (x1)	17p13.2	98,874	4,847,452	4,946,325	VUS
		del (x1)	17q21.31	17,051	43,986,396	44,003,446	VUS
		dup (x3)	19q13.31	29,404	44,858,873	44,888,276	Benigna
		dup (x3)	19q13.41	27,868	53,521,083	53,548,950	Benigna
		del (x1)	21p11.2-q21.3	12,714,972	14,613,203	27,328,175	Patogênica
		del (x1)	22q13.31	20,889	45,973,615	45,994,503	VUS

**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
16	34 CNVs; 6 dup, 11 del, 17 LOH	del (x1)	1q21.3	37,828	154,943,881	154,981,708	VUS
		del (x1)	1q32.1	146,127	204,262,260	204,408,386	VUS
		del (x1)	2q35	175,085	218,853,391	219,028,475	Benigna
		dup (x3)	4q31.21	199,046	144,825,754	145,024,799	Benigna
		del (x1)	5p15.33	85,22	1,992,423	2,077,642	Benigna
		del (x1)	6p25.3	49,815	1,742,794	1,792,608	VUS
		del (x1)	6p21.33	13,399	31,496,569	31,509,967	VUS
		dup (x3)	7p22.3	23,986	44,935	68,92	Benigna
		dup (x3)	7q22.1	159,093	100,968,363	101,127,455	Benigna
		del (x1)	8q24.3	113,627	142,877,020	142,990,646	Benigna
		del (x1)	13q12.3	110,172	30,515,553	30,625,724	Benigna
		del (x1)	14q32.13	80,559	96,025,715	96,106,273	Benigna
		del (x1)	15q15.1	62,257	42,274,461	42,336,717	Benigna
		del (x1)	17p13.3	63,537	8,547	72,083	Benigna



**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sintrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
		dup (x2)	Xp22.33	929,367	60,814	990,18	VUS
		dup (x2)	Xp22.33		2,055,410	2,689,575	Benigna
		dup (x2)	Xq28	303,022	154,933,691	155,236,712	VUS
		LOH	1p32.3-p31.3	9,172,553	54,376,730	63,549,282	Benigna
		LOH	1q42.3-q43	3,632,139	234,908,088	238,540,226	Benigna
		LOH	3q25.2-q26.32	21,399,813	154,812,696	176,212,508	Benigna
		LOH	4q35.1-q35.2	3,962,326	186,125,842	190,088,167	Benigna
		LOH	6p24.3-p22.3	6,223,690	10,586,006	16,809,695	Benigna
		LOH	6q22.31-q27	41,538,445	125,417,294	166,955,738	Benigna
		LOH	7p22.3-p22.2	4,128,512	83,185	4,211,696	Benigna
		LOH	7p21.3-p14.1	24,064,062	13,290,030	37,354,091	Benigna
		LOH	11p13-q13.4	34,933,308	35,874,466	70,807,773	Benigna
		LOH	11q23.3-q24.2	6,790,045	118,475,098	125,265,142	Benigna
		LOH	12q13.13-q22	44,329,236	51,774,695	96,103,930	Benigna

**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
		LOH	12q23.1-q24.11	10,562,921	99,598,289	110,161,209	Benigna
		LOH	12q24.31-q24.33	5,291,237	125,147,543	130,438,779	Benigna
		LOH	12q24.33	3,006,201	130,771,445	133,777,645	Benigna
		LOH	14q32.2-q32.31	4,430,986	97,568,613	101,999,598	Benigna
		LOH	17q22-q24.1	9,757,169	53,347,953	63,105,121	Benigna
		LOH	22q11.1-q11.21	4,662,600	16,114,244	20,776,843	Benigna
17	16 CNVs; 11 del, 5 dup	del (x1)	1p13.3	224,157	108,762,011	108,986,168	Benigna
		del (x1)	1p13.3	141,429	109,659,747	109,801,176	VUS
		del (x1)	2p21	17,312	45,177,541	45,194,853	Benigna
		del (x1)	2q32.1	128,347	183,881,657	184,010,004	VUS
		dup (x3)	4p16.1	225,286	10,128,354	10,353,640	Benigna
		del (x1)	7p14.1	67,349	38,319,671	38,387,020	Benigna
		del (x1)	8q21.13	20,916	82,548,968	82,569,884	Benigna
		dup (x3)	8q24.3	105,049	140,540,010	140,645,059	VUS
		dup (x3)	8q24.3	291,069	144,662,824	144,953,893	VUS
		del (x1)	9q33.3	200,37	127,554,115	127,754,485	VUS
		dup (x3)	9q34.3	581,390	139,268,640	139,850,030	VUS
		del (x1)	11q11	101,362	55,373,994	55,475,356	Benigna

**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sindrômico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação
18	7 CNVs; 6 del, 1 dup	dup (x3)	16p13.3	93,947	2,119,093	2,213,040	Benigna
		del (x1)	17q23.2	212,064	58,525,036	58,737,100	Benigna
		del (x1)	22q11.21	35,292	21,267,362	21,302,654	Benigna
		del (x1)	Xp22.33 ou Yp11.32	221,475	881,110 ou 831,110	1,102,585 ou 1,052,585	Benigna
		del (x1)	6p25.3	48,008	254,253	302,261	Benigna
		del (x1)	15q15.3	87,286	43,889,121	43,976,407	Benigna
		del (x1)	15q22.2	148,665	62,179,154	62,327,819	Benigna
		del (x1)	16p11.2	352,147	32,538,292	32,890,439	Benigna
		del (x1)	17q23.2	32,681	59,900,867	59,933,548	VUS
		dup (x3)	22q11.22	367,163	22,901,370	23,268,533	Benigna
del (x1)	22q11.23	12,555	23,577,098	23,589,653	Benigna		
19	3 CNVs; 1 del, 2 dup	del (x1)	7p14.1	112,874	38,292,547	38,405,421	Benigna
		dup (x3)	19p13.3	426,314	1,186,541	1,612,855	VUS
		dup (x2)	Xp22.33 ou Yp11.32	506,689	999,765 ou 949,765	1,506,454 ou 1,456,454	VUS
20	1 CNV; 1 del	del (x1)	6p25.3	48,008	254,253	302,261	Benigna
21	7 CNVs;	del (x1)	2q31.1	187,157	171,812,327	171,999,484	Benigna

**Tabela 5 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) identificadas nos pacientes com DDS sintromico avaliados no estudo.**

Paciente	Número de CNVs/Tipo	CNV (Del/Dup)	Localização Cromossômica	Tamanho (pb)	Início	Final	Classificação	
	4 del, 3 dup	dup (x3)	10q26.3	242,395	135,183,991	135,426,386	VUS	
		del (x1)	17q23.2	32,681	59,900,867	59,933,548	Benigna	
		del (x1)	19q13.2	9,859	42,414,743	42,424,602	Benigna	
		del (x1)	Xp22.33	55,412	1,356,077	1,411,489	Benigna	
		dup (x2)	Xq13.1	58,263	70,389,928	70,448,191	Benigna	
		dup (x2)	Xq13.1	57,423	70,479,822	70,537,245	VUS	
	22	5 CNVs, 1 del, 4 dup	dup (x3)	7p11.2	5,704,390	57,597,642	63,302,032	VUS
			dup (x3)	13q33.1	1,440,373	102,759,942	104,200,315	VUS
			del (x1) Mosaico	13q33.1	10,925,244	104,182,489	115,107,733	Patogênica
			del (x1)	13q33.1	10,901,934	104,205,799	115,107,733	Patogênica
			dup (x3)	16p11.2	1,311,590	32,892,213	34,203,803	Benigna
		dup (x3)	20p11.21	3,952,058	25,592,793	29,544,851	Benigna	

DDS: distúrbio/diferença do desenvolvimento sexual; CNV: variação do número de cópias genômicas; del: deleção; dup: duplicação; LOH: perda do estado heterozigoto; (x1): 1 cópia genômica; (x2): 2 cópias genômicas; (x3): 3 cópias genômicas; VUS: variante de significado incerto

O conteúdo gênico das CNVs patogênicas e provavelmente patogênicas identificadas nos pacientes portadores de DDS utilizando a técnica de *SNP-array* estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6 - Conteúdo gênico das CNVs patogênicas e provavelmente patogênicas encontradas nos pacientes utilizando a técnica de SNP-array**

Paciente	Alteração	Genes afetados (Número OMIM)	Classificação
2	Presença de material de 7 Mb na região Yp Início: 2,661,306 Fim: 9,690,184	<i>SRY (480000), RPS4Y1 (470000), ZFY (490000), TGIF2LY (400025), PCDH11Y (400022), AMELY (410000), TBL1Y (400033), PRKY (400008), TSPY1 (480100)</i>	Patogênica
2	Deleção de 1,7Mb na região 3q29; Início: 195,677,895; Fim: 197,413,261.	<i>TFRC (190010), SLC51A (612084), PCYT1A (123695), RNF168 (612688), WDR53 (615110), NRROS (615322), PIGX (610276), PAK2 (605022), SENP5 (612845), NCBP2 (605133), PIGZ (611671), MF12 (155750), DLG1 (611014), BDH1 (603063), KIAA0226 (613516)</i>	Patogênica
5	Presença de material de 7,1Mb na região Yp11.31 Início: 2,650,424 Fim: 9,768,860	<i>SRY (480000), RPS4Y1 (470000), ZFY (490000), TGIF2LY (400025), PCDH11Y (400022), AMELY (410000), TBL1Y (400033), PRKY (400008), TSPY1 (480100)</i>	Patogênica
5	Deleção de 9 Mb na região Xp22.33 Início: 2,693,466 Fim: 11,724,896	<i>XG (300879), GYG2 (300198), ARSD (300002), ARSE (300180), ARSH (300586), ARSF (300003), MXRA5 (300938), PRKX (300083), NLGN4X (300427), VCX3A (300533), PUDP (306480), STS (300747), VCX (300229), PNPLA4 (300102), VCX2 (300532), ANOS1 (300836), FAM9A (300477), FAM9B (300478), TBL1X (300196), GPR143 (300808), SHROOM2 (300103), CLCN4 (302910), MID1 (300552), HCCS (300056), ARHGAP6 (300118), AMELX (300391)</i>	Patogênica
6	Deleção de 12,043 bp no cromossomo 10q24.32;	<i>PITX3 (602669), ELOVL3 (611815)</i>	Provavelmente

<p>Início: 103,988,265; Fim: 104,000,307</p>	<p>patogênica</p>
<p>7 Deleção de 11,6Mb no cromossomo 10q25.3-q26.2; Início: 118,087,298; Fim: 129,753,712.</p>	<p><i>PNLIP (246600), PNLIPRP1 (604422) PNLIPRP2 (604423), HSPA12A (610701), KIAA1598 (611171), VAX1 (604294), KCNK18 (613655), SLC18A2 (193001), PDZD8 (614235), EMX2OS (607637), EMX2 (600035), RAB11FIP2 (608599), CASC2 (608598), PRLHR (600895), NANOS1 (608226), EIF3A (602039), PRDX3 (604769), GRK5 (600870), RGS10 (602856), TIAL1 (603413), BAG3 (603883), INPP5F (609389), MCMBP (610909), WDR11 (606417), FGFR2 (176943), ATE1 (607103), NSMCE4A (612987), TACC2 (605302), PLEKHA1 (607772), ARMS2 (611313), HTRA1 (602194), DMBT1 (601969), PSTK (611310), IKZF5 (606238), ACADSB (600301), HMX3 (613380), HMX2 (600647), BUB3 (603719), GPR26 (604847), CHST15 (608277), OAT (613349), FAM175B (611144), ZRANB1 (611749), CTBP2 (602619), MMP21 (608416), UROS (606938), BCCIP (611883), DHX32 (607960), FANK1 (611640), ADAM12 (602614), DOCK1 (601403), NPS (609513), PTPRE (600926)</i></p> <p>Patogênica</p>
<p>15 Duplicação de 6,5MB no cromossomo 14q11.2-q12 Início: 19,280,733; Fim: 25,869,811</p>	<p><i>OSGEP (610107), APEX (107748), PNP (164050), RNAE9 (614014), TRNAP1 (189930), TRL-AAG2-1 (189932), TRNAP2(189931), TRNAT2 (189933), ANG (105850), RNASE4 (601030), EDDM3A (611580), FAM12B (611582), RNASE6 (601981), RNASE1 (180440), RNASE3 (131398), RNASE2 (131410), METTL17 (616091), SLC39A2 (612166), NDRG2 (605272), TPPP2 (616956), RNASE7(612484), RNASE8(612485), SOLO (610018), ZNF219 (605036), HNRNPC (164020), RPGRIP1 (605446), SUPT16H (605012), CHD8 (610528), RAB2B (607466), TOX4 (614032), METTL3 (612472) SALL2 (602219), TRDC (186810), TRAC (186880), DAD1(600243), OXAIL (601066), SLC7A7 (603593), MRPL52 (611856), MMP14 (600754), LRP10 (609921), REM2 (616955), PRMT5 (604045), HAUS4 (613431), AJUBA (609066), PSMB5 (600306), PSMB11 (611137), CDH24 (618599), ACIN1(604562), CEBPE (600749), SLC7A8 (604235), HOMEZ, KIAA1443 (608119), BCL2L2 (601931), PABPN1 (602279), SLC22A17 (611461), EFS (609906), IL25 (605658), CMTM5 (607888), MYH6 (160710), MIR208A (611116), MYH7 (160760), MHRT (616096), MIR208B (613613), NGDN, NGD (610777), THTPA (611612), ZFH2 (617828), APIG2 (603534), DHRS2 (615194), DHRS4AS1 (616925), DHRS4 (611596), DHRS4L2 (615196), DHRS4L1 (615195), LRRC16B (614716), CPNE6 (605688), NRL (162080), PCK2 (614095), ARVD3 (602086), DFNB5(600792), SPG32 (611252), DCAF11 (613317), FITM1 (612028), PSME1 (600654), PSME2 (602161), RNF31 (612487), IRF9 (147574), REC8L1 (608193), TM9SF1 (618965), TSSK4 (610711), CHMP4A (610051), NEDD8 (603171), GMPR2 (610781), TINF2 (604319), TGM1 (190195), RABGGTA (601905), DHRS1(610410), NOP9 (618308), CIDEA (604441), LTB4R2 (605773), LTB4R (601531), ADCY4 (600292), RIPK3 (605817), NFATC4 (602699), CBLN3 (612978), SDR39U1 (616162), CMA1 (118938), CTSG (116830), GZMH (116831),</i></p> <p>Patogênica</p>

*GZMB (123910), STXBP6 (607958)*

15	<p>Deleção de 12,7MB no cromossomo 21p11.2-q21.3            Início: 14,613,203;            Fim: 27,328,175</p>	<p><i>POTED (607549), LIPI (609252), RBM11 (617937), ABCC13 (608835), STCH (601100), SAMSNI (607978), NRIP1 (602490), USH1E (602097), MIR99AHG (615964), MIR99A (614509), MIRLET7C (612144), MIR125B2 (610105), CXADR (602621), BTG3 (605674), CHODL (607247), TMPRSS15 (606635), NCAM2 (602040), MIR155(609337), MRPL39 (611845), JAM2 (606870), ATP5PF (603152), GABPA (600609), APP (104760)</i></p>	Patogênica
22	<p>Deleção de 10,9Mb no cromossomo 13q33.1;            Início: 104,182,489            Fim: 115,107,733</p>	<p><i>DAOA-ASI (607415), DAOA (607408), EFN2 (600527), ARGLU1 (614046), LIG4 (601837), TNFSF13B (603969), MYO16 (615479), IRS2 (600797), COL4A1 (120130), COL4A2 (120090), NAXD (615910), CARS2 (612800), INGI (601566), ARHGEF7 (605477), SOX1 (602148), ATP11A (605868), MCF2L (609499), F7 (613878), F10 (613872), PROZ (176895), PCID2 (613713), CUL4A (603137), LAMP1 (153330), ADPRHL1 (610620), TFDPI (189902), ATP4B (137217), GRK1 (180381), GAS6 (600441), RASA3 (605182), CDC16 (603461), UPF3A (605530), CHAMP1 (616327)</i></p>	Patogênica



## 5.1 Descrição dos resultados dos *arrays* nos pacientes com CNV patogênicas ou provavelmente patogênicas

### 5.1.1 Paciente 2

Paciente com sexo social masculino designado ao nascimento, nascido a termo, fruto de uma gestação sem intercorrências. Pais não consanguíneos e saudáveis. Possui irmã também saudável. Iniciou seguimento no serviço de Genética Médica aos 8 anos devido a dificuldade escolar, atraso de linguagem, epilepsia e presença de dismorfismos faciais e corpóreos como sobrancelhas unificadas, orelhas proeminentes, ponte nasal elevada, mamilo extranumerário, restrição articular de joelhos e tornozelos, baixa estatura e hipermetropia com astigmatismo. Ecocardiograma demonstrou a presença de um forame oval patente. Nenhuma anormalidade na genitália externa foi observada. A investigação de outras malformações congênicas foi realizada com USG de abdome total, que não revelou anormalidades. Ressonância nuclear magnética (RNM) de encéfalo revelou leucomalácia periventricular bilateral e inespecífica. A avaliação oftalmológica identificou que o paciente apresentava hipermetropia e astigmatismo. Durante a investigação genética foi solicitada a realização de cariótipo convencional cujo resultado foi 46,XX.

Visto a incongruência entre o sexo cromossômico e o fenótipo genital, o paciente aos 8 anos e meio de idade cronológica foi encaminhado à Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento para esclarecimento diagnóstico. Os dados da avaliação clínica e dados hormonais referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia estão apresentados na Tabela 7.

Paciente com idade cronológica de 8,5 anos, estava bem clinicamente, com crescimento adequado ao seu alvo genético familiar. Apresentava estádio puberal de G1P1 de Tanner, ainda pré púbere e com ausência do desenvolvimento de mamas. Dosagens hormonais basais de LH, FSH, Testosterona total, estradiol também estavam em níveis pré puberais (Tabela 7).

Paciente iniciou a puberdade espontaneamente aos 10 anos e 9 meses. Na última consulta ambulatorial apresentava estágio puberal G3P3 e ausência de ginecomastia porém, o perfil hormonal apresentava gonadotrofinas elevadas para a

idade, indicando provável evolução para hipogonadismo hipergonadotrófico (Tabela 7). Reposição com testosterona ainda não havia sido iniciada uma vez que a última dosagem de testosterona ainda dentro do limite de normalidade para idade. Paciente em seguimento ambulatorial.

Baseado na investigação realizada, o diagnóstico de DDS 46,XX por anormalidade do desenvolvimento gonadal foi estabelecido. O estudo histológico do tecido gonadal é essencial para o estabelecer o diagnóstico diferencial desta condição, diferenciando-se DDS 46,XX ovário-testicular (quando se identifica a presença de tecido testicular - túbulos seminíferos, e tecido ovariano- folículos ovarianos, no mesmo indivíduo) de DDS 46,XX testicular (quando se identifica apenas a presença de tecido testicular). Apesar da histologia do tecido gonadal não ter sido avaliada, propomos o diagnóstico de DDS 46,XX testicular. Esta hipótese diagnóstica foi baseada nas características fenotípicas do paciente, na ausência de derivados mullerianos ao USG de pelve e na sua evolução clínica e hormonal, uma vez que na puberdade não apresentou sinais clínicos de ação estrogênica e manteve níveis séricos dos esteróides sexuais compatíveis com os valores de referência para o sexo masculino da mesma faixa etária.

**Tabela 7 - Dados da avaliação clínica e hormonal referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia do paciente 2.**

	<b>Primeira avaliação</b>	<b>Seguimento ambulatorial (4 anos de acompanhamento)</b>
<b>Idade cronológica (anos)</b>	8,5	12,3
<b>Altura (cm)/ Escore Z de altura</b>	122 (-1,03)	148 (-0,43)
<b>Altura alvo para sexo social (cm) / Escore Z de altura alvo</b>	171 (masc -0,48)	
<b>Genitália externa</b>	Típica	
<b>Tamanho peniano (cm)</b>	6,0X1,5	7,5X2,5
<b>Tamanho testicular (cm)</b>	1,8X1,0 D; 2,0X1,0 E	2,0X1,3 D; 2,5X1,5 E
<b>Desenvolvimento Puberal</b>	G1P1 / Sem ginecomastia	G3P3 / Sem ginecomastia
<b>Dismorfismos</b>	sobrancelhas retificadas e bem marcadas, orelhas com sobredobramento das hélices, telangectasias em pálpebras e face, mamilos invertidos, mamilo extranumerário à direita, restrição de motilidade articular de joelhos e tornozelos	
<b>US pélvica/escrotal</b>	Ausencia de derivados mullerianos	
<b>LH (U/L)</b>		
<b>Valor normal:</b>	<0,1	26,6
<b>Pré púbere: &lt; 0,3 Homem: 1,7 a 8,6</b>		
<b>FSH (U/L)</b>		
<b>Valor normal para Homem: 1,5 a 12,4</b>	1,0	17,9
<b>Testosterona (ng/dL)</b>		
<b>Valor normal:</b>	<12	154
<b>Pré púbere: 0 a 40 Homem: 249 a 836</b>		
<b>Estradiol (pg/mL)</b>		
<b>Valor normal:</b>	<15	<17
<b>Pré púbere: &lt;20 Homem: &lt;42,6</b>		

US: ultrassonografia; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio foliculo-estimulante; D- direito; E- esquerdo; G1: primeiro estágio do desenvolvimento genital de Tanner; P1: primeiro estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner; G3: terceiro estágio do desenvolvimento genital de Tanner; P3: terceiro estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner.

Por tratar-se de um indivíduo com cariótipo 46,XX e genitália externa masculina normal e fenótipo sindrômico, foi optado por complementar a investigação utilizando a técnica de *SNP-array*. A análise do *SNP-array* revelou a presença de 12 CNVs (10 deleções e duas duplicações e um fragmento do cromossomo de Y adicional). Das CNVs identificadas, duas foram consideradas patogênicas e relacionadas ao fenótipo sindrômico do paciente e as demais foram categorizadas como VUS (quatro CNVs) e benignas (seis CNVs).

As CNVs categorizadas como patogênicas foram uma deleção localizada no braço longo do cromossomo 3,  $\text{arr}[\text{GRCh37}]3\text{q}29(195,677,895-197,413,261)\times 1$ , e a presença de fragmento adicional do braço curto do cromossomo Y, contendo o gene *SRY*  $\text{arr}[\text{GRCh37}]Y\text{p}11.31(2,661,306-9,690,184)\times 1$  (Tabela 6 e Figura 5).

A determinação da presença de material do braço curto do cromossomo Y, reforçou a hipótese diagnóstica de DDS 46,XX testicular *SRY+*. A confirmação da presença de material genômico de Y no DNA do paciente 2 foi realizada pela técnica de MLPA utilizando o kit *SALSA MLPA P095-A3 Aneuploidy probemix* (MRC-Holland). Com essa técnica foi possível verificar a presença dos genes *SRY* e *ZFY* localizados no Yp11.31 e a ausência do gene *UTY* localizado em Yq11.221. A confirmação da presença de material genômico de Y no DNA do paciente 2 foi também realizada pela técnica de PCR. Com essa técnica foi possível verificar a presença dos genes *SRY* (p11.31), *TSPY* (p11.2), e ausência dos genes *AMELY* (p11.2), *DYZ3* (centrômero), *DYS280* (q11.22), *DYS1* (q11.22).

O gene *SRY* codifica um fator de transcrição, membro do grupo da família de proteínas de ligação ao DNA de alta mobilidade (HMG)-box. Esta proteína é o fator determinante do testículo (TDF), desencadeando o início do processo de desenvolvimento testicular e a determinação do sexo masculino. A presença do gene *SRY* em indivíduos 46,XX é uma causa bem estabelecida de DDS testicular e a provável causa do DDS desse paciente.

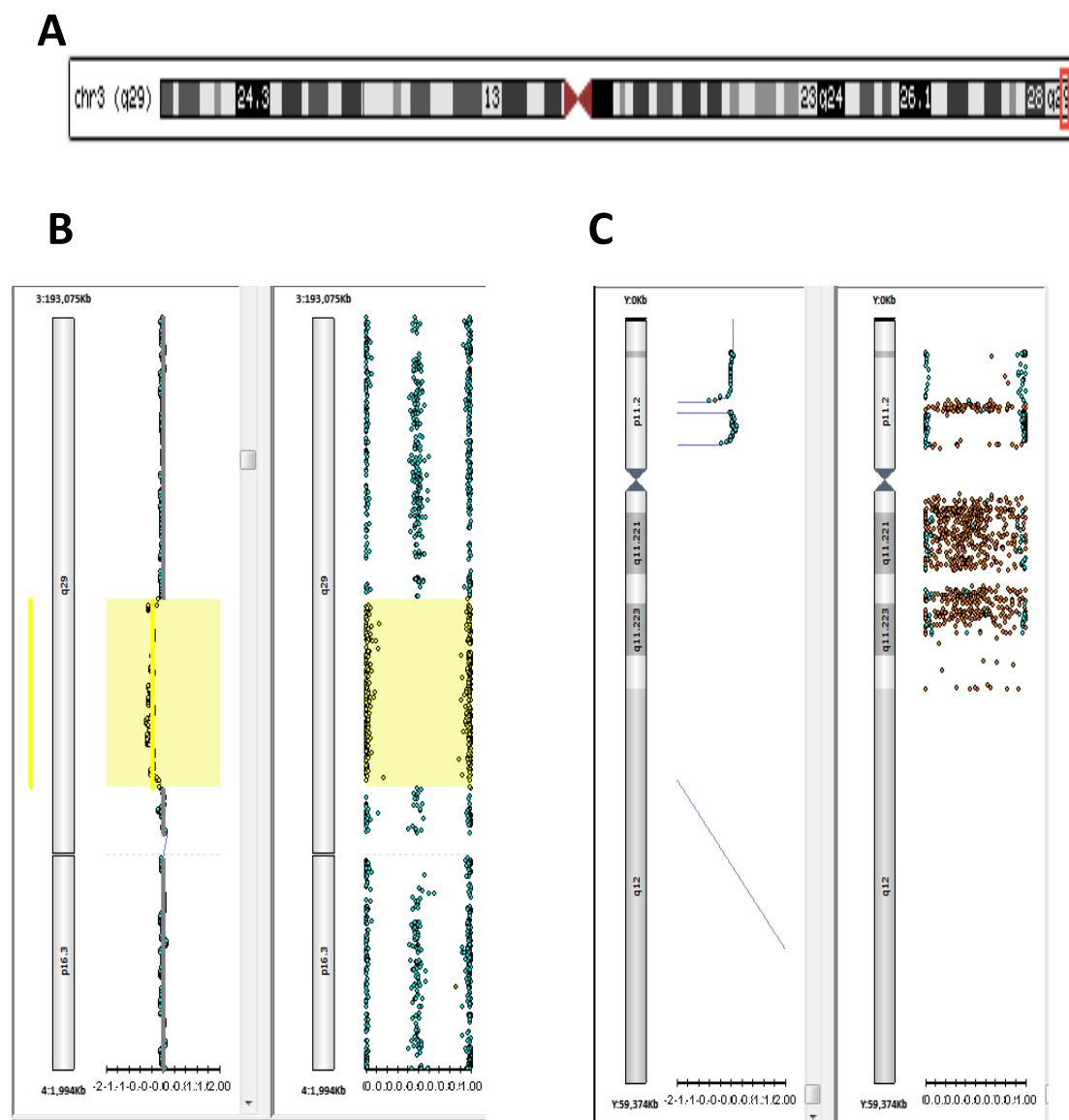
A deleção  $\text{arr}[\text{GRCh37}]3\text{q}29(195,677,895-197,413,261)\times 1$  de 1,7Mb estava localizada na região cromossômica 3q29, a qual compreende 15 genes OMIM (Tabela 6). A análise dessa CNV demonstrou tratar-se de uma CNV rara, não observada nos indivíduos saudáveis descritos na plataforma DGV.

Diversas síndromes e fenótipos clínicos relacionados a alterações nos genes localizados na região cromossômica 3q29 já foram descritos em humanos (Tabela 6).

Na base de dados OMIM é descrita a síndrome de microdeleção 3q29 (OMIM #609425), uma síndrome causada pela deleção de genes contíguos caracterizada por dismorfismos faciais e corporais (face afilada, feltro labial curto, orelhas proeminentes e de implantação baixa e rotação posterior, ponte nasal alta e afilamento de do lábio superior, quirodáctilos afilados e longos, clinodactilia) associados a graus variados de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, fenótipo semelhante ao apresentado pelo paciente.

Na base de dados do DECIPHER, diversos pacientes com deleções da região 3q29 e com fenótipo de dismorfismos corporais e faciais e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor são relatados. De acordo com a análise dos critérios de classificação de patogenicidade das CNVs e da caracterização do seu conteúdo gênico, essa CNV foi considerada patogênica e associada ao fenótipo apresentado pelo paciente.

A presença da deleção na região 3q29 foi confirmada pela técnica de MLPA utilizando o *kit* SALSA MLPA probemixes P036-E1 Human Telomere-3, que evidenciou uma redução de sinal correspondente ao exon 4 do gene *BDHI*, que está contido na região cromossômica deletada identificada no *SNP-array*. O estudo do DNA dos pais foi realizado pela mesma técnica de MLPA, confirmando que a deleção 3q29 não foi herdada.



**Figura 5 - Representação das CNVs patogênicas identificadas no paciente 2.** A) Representação do cromossomo 3. A barra vermelha destaca a região cromossômica deletada 3q29 identificada no estudo de SNP-array. B) Imagem do SNP-array demonstrando a redução da intensidade do sinal gerado e da perda do estado de heterozigose no cromossomo 3. C) Representação do cromossomo Y. Imagem do SNP-array compatível com a presença de material de Yp em paciente 46,XX.

### 5.1.2 Paciente 5

A paciente 5 iniciou seguimento na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do HC-FMUSP aos 30 anos por ausência parcial do desenvolvimento dos caracteres sexuais. Paciente do sexo social feminino designado ao nascimento, nascida a termo, fruto de uma gestação sem intercorrências. Pais não consanguíneos e saudáveis, filha única. A genitora da paciente referia acompanhamento prévio da paciente no Departamento de Genética de outro serviço médico, com suspeita diagnóstica de síndrome de Fraser (OMIM #219000). Esta hipótese diagnóstica foi proposta na infância, devido à presença de microftalmia com amaurose bilateral associada a anormalidade da genitália externa (clitoromegalia). Paciente apresentou convulsões, diagnosticada aos 2 anos de idade seguindo em acompanhamento ambulatorial pela neurologia infantil e tratamento com carbamazepina. Durante a investigação genética foi realizado um cariótipo, cujo resultado foi 46,XX sem anormalidades estruturais ou numéricas identificadas. Encaminhada a endocrinologia para avaliação do desenvolvimento puberal.

O exame físico genital realizado aos 30 anos de idade revelou clitoromegalia (4,0X2,0cm), pregas labiais assimétricas e com fusão parcial, orifício perineal único e gônada palpável em canal inguinal a direita e ausente a esquerda. Ausência de derivados müllerianos foi observada na ultrassonografia pélvia. Ressonância magnética de pelve revelou além da ausência de derivados müllerianos, a presença de gônadas bilateralmente em canal inguinal. No exame de imagem, os tecidos gonadais foram descritos como estruturas sólidas, hipocogênicas sugestivas de testículos bilaterais; aguarda biópsia gonadal.

Além da atipia genital, a paciente possuía obesidade (IMC 31,5), microftalmia associada a amaurose bilateral, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor com epilepsia associada e malformação estrutural do sistema nervoso evidenciado nos exames de imagem. A Tomografia de crânio e Ressonância magnética de encéfalo revelaram: agenesia de corpo caloso e septo pelúcido, redução volumétrica de lobos temporais e hipocampo, dilatação do sistema ventricular e hipotrofia dos globos oculares.

As dosagens hormonais realizadas para a avaliação da função gonadal aos 30 anos revelaram níveis séricos de Testosterona total baixo (T- 22,4 ng/dL; valor

normal: homem – 241-827 ng/dL; mulher fase folicular 14-76 ng/dL) e de estradiol dentro da variação normal (estradiol- 21pg/ml; valor normal: homem - < 52pg/mL; mulher fase folicular : 1,3 a 266,0 pg/mL) com níveis de gonadotrofinas normais (LH- 2,62 UI/L; valor normal homens- 1,5 - 9,3 UI/L; mulher fase folicular - 1,9 - 12,5 UI/L; FSH- 4,4 UI/L; valor normal homem - 2,0 - 12,8 UI/L; mulher fase folicular : 3,1 - 15,7 UI/L). O diagnóstico de hipogonadismo com gonadotrofinas inapropriadamente normais foi estabelecido baseado no perfil hormonal. Os valores de ACTH, TSH, PRL, GH-IGF1 foram normais para a faixa etária da paciente. Os dados da avaliação clínica e dados hormonais referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia estão apresentados na Tabela 8.

A paciente deseja realizar feminização genital e gonadectomia bilateral e aguarda a realização dos procedimentos.

Os achados clínicos, hormonais e radiológicos da paciente basearam a hipótese diagnóstica de DDS 46,XX por anormalidade do desenvolvimento gonadal, hipogonadismo com gonadotrofinas inapropriadamente normais associado a malformações oculares e neurológicas com fenótipo convulsivo.

Por tratar-se de um indivíduo com cariótipo 46,XX e genitália externa atípica e fenótipo sindrômico, foi optado por complementar a investigação utilizando a técnica de *SNP-array*. A análise do *SNP-array* revelou a presença de sete CNVs (4 duplicações e 3 deleções). Das CNVs identificadas, 2 foram consideradas patogênicas e relacionadas ao fenótipo sindrômico da paciente e as demais foram categorizadas como benignas. As CNVs consideradas patogênicas foram uma deleção no cromossomo X arr[GRCh37]Xp22.33(2,693,466-11,724,896)x1 e a presença de material do braço curto do cromossomo Y contendo o gene *SRY* arr[GRCh37]Yp11.31(2,650,424-9,768,860)x1 (Figura 6).

O *SRY* constitui o fator determinante do testículo, como referido anteriormente (paciente 2) e é membro do grupo da família de proteínas de ligação ao DNA de alta mobilidade (HMG)-box. A determinação da presença de material do braço curto do cromossomo Y, fortaleceu a hipótese diagnóstica de DDS 46,XX, *SRY+* por anormalidade do desenvolvimento gonadal.



**Tabela 8 - Dados da avaliação clínica e hormonal referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia do paciente 5.**

	Primeira consulta	Primeira avaliação	Última avaliação
	Neurologia	Endocrinologia	Endocrinologia
<b>Idade cronológica (anos)</b>	3	31	32
<b>Altura (cm) /Escore Z de altura</b>	97 (Z 0,62)	167,5 (Z 0,57)	167,5 (Z 0,57)
<b>Altura alvo para sexo social (cm) / Escore Z de altura alvo</b>	163 (Z 0)		
<b>IMC</b>	16,8 (Z 0,95)	31,5	30,1
<b>Genitália externa</b>	ND	Clitoromegalia, Fusão lábio escrotal parcial, orifício perineal único, gônadas não palpáveis	
<b>Tamanho clitóris (cm)</b>	ND	4,0X2,0	
<b>Tamanho gonadal avaliado na RNM (cm)</b>	ND	1,8X1,1X1,4 D; 2,2X1,4X1,2 E	
<b>Desenvolvimento puberal</b>	M1P1	M3P5	
<b>Dismorfismos</b>	Microftalmia		
<b>US pélvica/RNM</b>	ND	Derivados müllerianos não identificados	
<b>LH (U/L)</b>			
<b>Valor normal:</b>	ND	2,62	2,6
<b>Mulheres fase folicular: 2,4 a 12,5 mUI/mL</b>			
<b>FSH (U/L)</b>			
<b>Valor normal: Fase folicular : 3,1 a 15,7 mUI/mL</b>	ND	4,39	3,8
<b>Testosterona (ng/dL)</b>			
<b>Valor Normal: &lt;27</b>	ND	22,4	<12
<b>Estradiol (pg/mL)</b>			
<b>Valor Normal fase folicular: 1,3 a 266,0</b>	ND	21	<17

US: ultrassonografia; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio folículo-estimulante; D- direito; E- esquerdo; M1: primeiro estágio do desenvolvimento mamário de Tanner; P1: primeiro estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner; M3: terceiro estágio do desenvolvimento mamário de Tanner; P3: terceiro estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner; IMC: índice de massa corporal; ND: não disponível.

A confirmação da presença de material genômico de Y no DNA do paciente 5 foi realizada pela técnica de sequenciamento pelo método de Sanger. Com essa técnica foi possível determinar a presença dos genes *SRY* (p11.31), *TSPY* (p11.2), *AMELY* (p11.2), e ausência dos genes *DYZ3* (centrômero), *DYS280* (q11.22), *DYS1* (q11.22).

Como o estudo histológico do tecido gonadal não foi realizado até o momento, não é possível estabelecer o diagnóstico do tipo de DDS 46,XX por anormalidade do desenvolvimento gonadal que acomete esta paciente. Além disso, as características fenotípicas genitais da paciente (atipia genital) e a sua evolução clínica, com ausência de desenvolvimento puberal espontâneo e níveis inapropriadamente normais de gonadotrofinas interferem na avaliação da capacidade de produção dos esteróides gonadais, ferramentas que poderiam auxiliar na formulação de uma hipótese diagnóstica.

A deleção Xp22.33 identificada na paciente 5 determinou a perda de 9,1MB do braço curto do cromossomo X. Essa região contém 26 genes OMIM já relacionados anteriormente com fenótipos deletérios em humanos quando mutados. No banco de dados de indivíduos saudáveis, alterações na região Xp22.3 com dimensões comparáveis a da paciente em estudo não são descritas, sendo considerada rara não estando descrita em nenhum indivíduo saudável na base de dados do DGV.

Na base de dados do DECIPHER existe a descrição de diversos indivíduos com perda de material gênico em região semelhante à da nossa paciente e com fenótipo de comprometimento do desenvolvimento neuropsicomotor e transtorno do espectro autista, assim como dismorfismos diversos faciais e corporais, incluindo malformações oculares.

A perda da região Xp22.33 já foi anteriormente associada a síndrome de Aicardi. Esta síndrome é classicamente composta por uma tríade: Agenesia/hipoplasia de corpo caloso, alterações coriorretinianas e espasmos infantis. Todas essas alterações estão presentes em nossa paciente e nos permite diagnosticá-la com síndrome de Aicardi.

Apesar do gene *KAL1/ANOS1* estar contido nessa região, a perda de uma única cópia do gene não explica o fenótipo de hipogonadismo hipogonadotrófico apresentado pela paciente. Sequenciamente através de painel de genes para

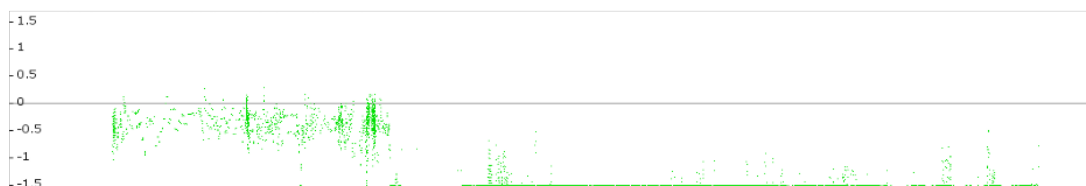
hipogonadismo foi realizado que não evidenciou alteração no sequenciamento do gene *KAL1*. Não houve também nenhuma variante patogênica ou provavelmente patogênica em nenhum dos outros genes conhecidos e sequenciados pelo painel.

A análise dos *arrays* realizados com as amostras do DNA dos pais da paciente 5 não revelou a presença de CNVs patogênicas, comprovando que a deleção Xp22.33 foi *de novo*. As duas CNVs localizadas na região cromossômica 10q11.21 e 10q11.22 da paciente foram categorizadas como benignas e foram identificadas na amostra materna, tendo sido herdadas pela paciente.

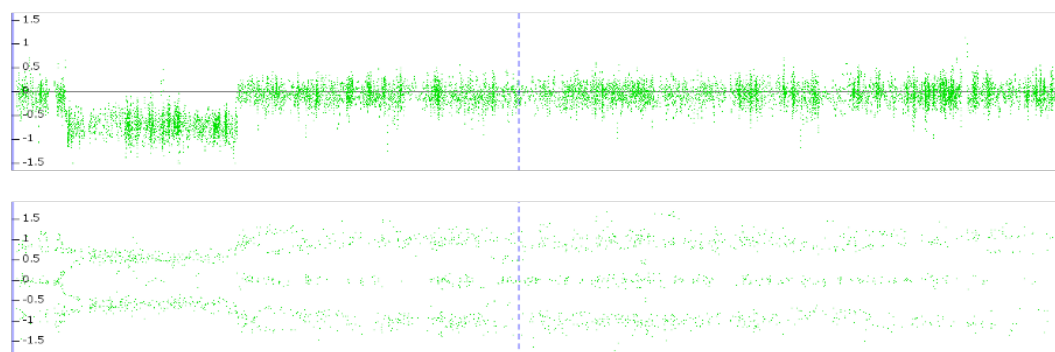
**A**



**B**



**C**



**Figura 6: Representação das CNVs patogênicas do paciente 5.** A) A barra vermelha destaca a região cromossômica deletada identificada no estudo de *array* Xp22.33 e a presença

de material de Yp11.31. B) Imagem do *SNP-array* demonstrando a redução da intensidade do sinal gerado e da perda do estado heterozigoto da região Xp22.33. C) Imagem do *SNP-array* compatível com a presença de material de Yp11.31 em paciente 46,XX.

### 5.1.3 Paciente 6

Paciente do sexo social masculino designado ao nascimento, encaminhado para avaliação na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento aos 2 anos e 3 meses por genitália atípica ao nascimento. Fruto de um casamento não consanguíneo, nascido a termo após uma gestação sem intercorrências, adequado para idade gestacional.

A genitália atípica era caracterizada por hipospádia proximal, pênis medindo 4,5 cm (Z score - 0,25), bifidez escrotal e criptorquidia bilateral. Não foram identificados derivados mullerianos após realização de ultrassonografia pélvica. Em resposta ao teste do estímulo com hCG (6 doses de 2.500 UI com intervalos de uma semana) houve incremento da testosterona (174 ng/dL, 72h após última injeção) sem acúmulo de precursores. Paciente realizou correção cirúrgica da genitália (ortofaloplastia com neouretroplastia e posterior correção de fístula uretral) assim como orquipexia bilateral aos 5 anos. Paciente apresentava também catarata congênita e epilepsia associado a leve atraso da fala e rendimento escolar abaixo do esperado para a faixa etária. Os dados da avaliação clínica e dados hormonais referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia estão apresentados na Tabela 9.

Durante a investigação etiológica, o paciente realizou cariótipo, cujo resultado foi 46,XY sem anormalidades estruturais ou numéricas. A análise do gene do receptor androgênico foi realizada e nenhuma variante alélica patogênica foi identificada.

Por tratar-se de um indivíduo com cariótipo 46,XY, portador de genitália externa atípica e fenótipo sindrômico neurooftalmológico, foi optado por complementar a investigação utilizando-se a técnica de *SNP-array*.

**Tabela 9 - Dados da avaliação clínica e hormonal referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia do paciente 6.**

Primeira avaliação		
<b>Idade cronológica (anos)</b>	2,25	12,5
<b>Altura (cm)/Escore Z de altura</b>	87 (-0,50)	145 (-0,97)
<b>Altura alvo para sexo social (cm) / Escore Z de altura alvo</b>	169 (Z -0,85)	
<b>Genitália externa</b>	Hipospadia perineal, testículos retrateis bilaterais, bolsa bífida, micropenis limítrofe (-2,5)	
<b>Tamanho peniano (cm) / Escore Z penis</b>	4,0 (Z-2,3) → 5,2 (Z -1,1) (após uso de testosterona, 2 doses, 50 mg/dose)	6,0X2,2 (Z-2,16)
<b>Tamanho testicular (cm)</b>	1,3X1,1X0,7 (D); 1,8X0,7X1,3 (E)	3,5X2,5 (D); 3,5X2,0 (E)
<b>Desenvolvimento puberal</b>	G1P1 / Sem ginecomastia	G2P2 / Sem ginecomastia
<b>Dismorfismos</b>	ausente	
<b>US pélvica/escrotal</b>	Ausencia de derivados mullerianos Testiculos inguinais: 1,3X1,1X0,7cm (D) 1,8X0,7X1,3 (E)	ND
<b>LH (U/L)</b>	0,1	1,3
<b>Valor normal:</b>		
<b>Pré púbere: &lt; 0,3 Homem: 1,7 a 8,6</b>		
<b>FSH (U/L)</b>		
<b>Valor normal:</b>	<1,0	2,9
<b>Homem: 1,5 a 12,4</b>		
<b>Testosterona (ng/dL)</b>	<12 → 174*	36
<b>Valor normal:</b>		
<b>Pré púbere: 0 a 40 Homem: 249 a 836</b>	*teste do HCG	
<b>Estradiol (pg/mL)</b>	<11,8	<17
<b>Valor normal:</b>		

**Pré púbere: <20 Homem: <42,6**

US: ultrassonografia; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio folículo-estimulante; D- direito; E- esquerdo; G1: primeiro estágio do desenvolvimento genital de Tanner; P1: primeiro estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner; G2: segundo estágio do desenvolvimento genital de Tanner; P2: segundo estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner; IMC: índice de massa corporal; ND: não disponível.

A investigação por *array* revelou a presença de oito CNVs, todas eram deleções (Tabela 5). Das CNVs identificadas, uma CNV foi categorizada como provavelmente patogênica e relacionada ao fenótipo sindrômico do paciente e as demais CNVs foram categorizadas como VUS (5 CNVs) e benignas (2 CNVs).

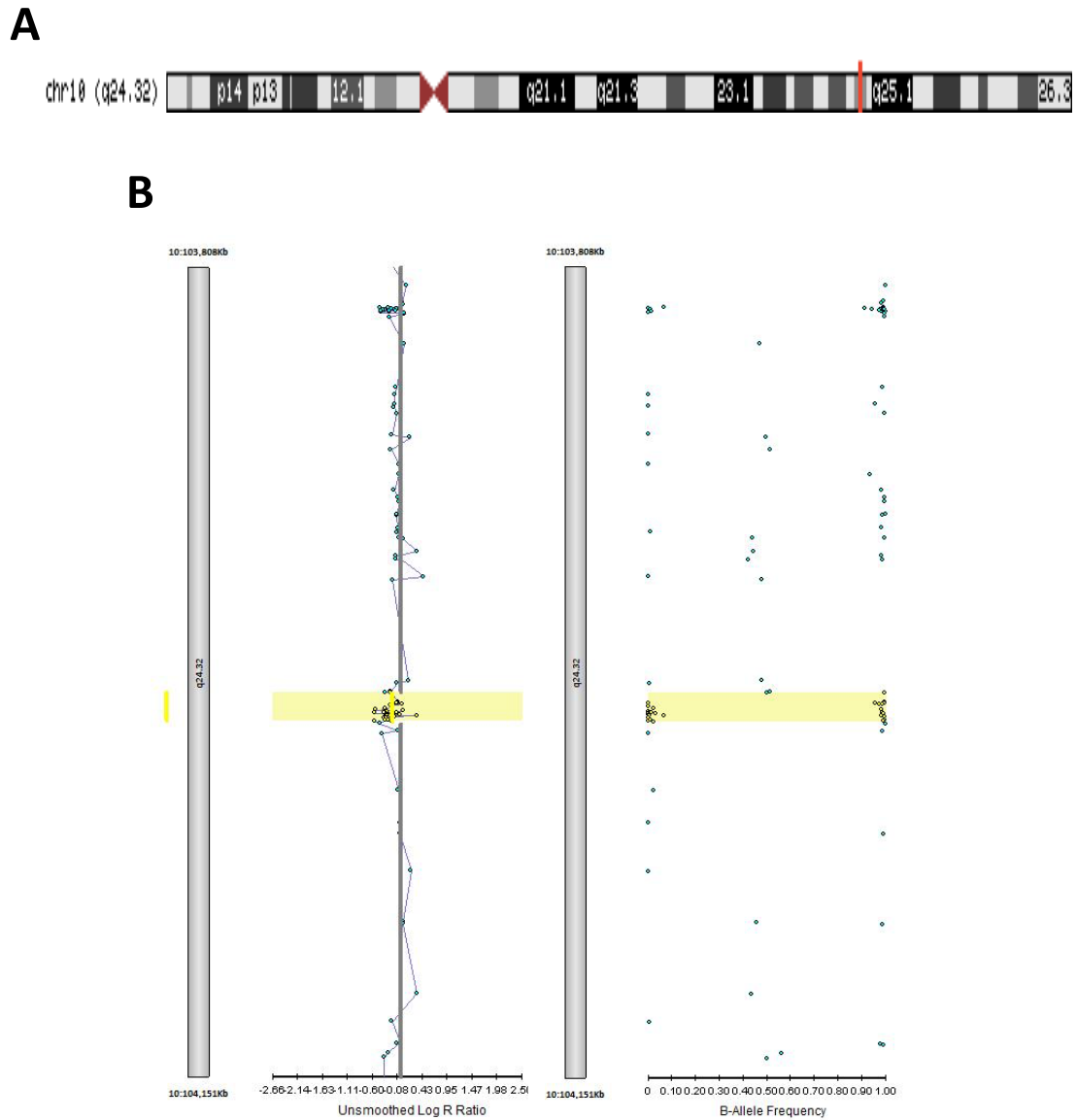
A CNV patogênica consistia em uma deleção de 12Kb localizada no cromossomo 10q24.32 (arr[GRCh37]10q24.32(103,988,265-104,000,307)x1) que comprometia a hibridação de 34 *beads* contínuas (Figura 7). A região deletada continha dois genes OMIM, sendo um deles relacionado ao fenótipo do paciente (Tabela 6).

O gene *PITX3*, situado na região deletada, foi relacionado como um gene candidato ao fenótipo de catarata congênita apresentada pelo paciente. Este gene codifica um membro da família homeobox RIEG/PITX, da classe bicoide das proteínas do homeodomínio e que atua como um fator de transcrição (AKULA; PARK; WEST-MAYS, 2018). A proteína PITX3 está envolvida na formação do cristalino durante o desenvolvimento do olho, e variantes patogênicas foram associadas à catarata congênita e à disgenesias mesodérmicas da câmara anterior do olho (ASMD) (BIDINOST; MATSUMOTO; CHUNG; SALEM *et al.*, 2006; BURDON; MCKAY; WIRTH; RUSSELL-EGGIT *et al.*, 2006; GRAW, 2004; ZAZO SECO; PLAISANCIE; LUPASCO; MICHOT *et al.*, 2018). Ele também atua na especificação e diferenciação terminal de neurônios dopaminérgicos da substância negra compacta do mesencefalo porém, com repercussões clínicas ainda desconhecidas em relação ao acometimento encefálico (AKULA; PARK; WEST-MAYS, 2018; CHEN; KANG; TANG; GAO, 2017). O tipo de herança ligada a catarata congênita na variante patogênica do *PITX3* pode ser autossômica dominante ou recessiva. O escore de haploinsuficiência do gene *PITX3* foi de pLI 0,813. Quanto mais próximo de 1 for o pLI maior a chance do gene sofrer haploinsuficiência, mecanismo que poderia ser o responsável pelo fenótipo do nosso paciente.

Há na literatura a descrição de uma família com mutação do *PITX3* e fenótipo de catarata congênita associada a alteração do neurodesenvolvimento, quadro semelhante ao apresentado pelo nosso paciente (BIDINOST; MATSUMOTO; CHUNG; SALEM *et al.*, 2006).

Outros genes reconhecidamente envolvidos no processo de desenvolvimento sexual não foram identificados na região deletada nem nas outras CNVs do paciente. A análise *in silico* da CNV localizada na região 10q24.32 revelou tratar-se de uma CNV rara, não descrita no banco de dados de indivíduos saudáveis. A pesquisa realizada no banco de dados DECIPHER identificou a descrição de 5 indivíduos síndrômicos com deleções 10q grandes (>5MB) e que continham a região de perda cromossômica encontrada no paciente 6. Desses pacientes, um apresentava alteração da visão com hipermetropia/astigmatismos e estrabismo (392832). Anormalidades no aparelho genitourinário não foram relatadas nesses pacientes.

Na análise do *array* realizado em amostra do DNA da mãe do paciente 6 nenhuma das nove CNVs encontradas no paciente foram identificadas. O DNA paterno não era disponível para análise.



**Figura 7: Representação da CNV patogênica do paciente 6.** (A) A barra vermelha destaca a região cromossômica deletada identificada no estudo *de array* 10q24.32. (B) Imagem do SNP-*array* demonstrando a redução da intensidade do sinal gerado e da perda do estado heterozigoto.



#### 5.1.4 Paciente 7

Paciente 7, sexo social masculino designado ao nascimento, iniciou seguimento na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo ainda no primeiro ano de vida devido a quadro de genitália atípica ao nascimento. Filho de um casal saudável e não consanguíneo, após uma gestação a termo, tendo nascido com peso insuficiente para idade (PN: 2670g), perímetro cefálico normal (PC: 33cm; Z-score: -1,1) e pequeno para idade gestacional (comprimento 45cm; Z-score: -2,1). Ao nascimento foi identificada a presença de anomalia anorretal com ânus imperfurado e genitália atípica, caracterizada ainda na sala de parto por fálus de tamanho adequado (sem registro da medida ao nascimento), orifício perineal único com hipospádia perineal, bolsa escrotal bífida e hipodesenvolvida e gônadas não palpáveis. O paciente apresentava dismorfismos faciais e corpóreos como fenda palatina incompleta, palato ogival, hipertelorismo mamário, prega palmar única e pés planos com o segundo pododáctilo curvo. Persistência do canal arterial foi detectado após ecocardiograma ainda na maternidade. No primeiro mês de vida apresentou meningite neonatal com necessidade de hospitalização em UTI neonatal e perda auditiva neurossensorial atribuída ao quadro infeccioso.

Paciente realizou correção cirúrgica do ânus imperfurado nos primeiros dias de vida com restabelecimento do trânsito intestinal no mesmo tempo cirúrgico. A persistência do canal arterial foi corrigida cirurgicamente no primeiro ano de vida. Por não ter realizado dosagens hormonais basais ainda na “minipuberdade”, realizou aos 3 anos de idade teste de estímulo com hCG, cujo resultado revelou incremento dos níveis de testosterona para 158ng/dL, sem acúmulo de precursores. Também aos 3 anos foi submetido a videolaparoscopia para identificação das gônadas e correção da criptorquidia, sendo realizado neste procedimento a orquipexia (até região inguinal) de gônada direita e não encontrado a gônada esquerda.

Na sua penúltima avaliação na Unidade de Endocrinologia aos 11 anos, o paciente ainda não apresentava início do desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e os níveis de LH, FSH e Testosterona eram compatíveis com o estágio pré puberal. Sua estatura era no limite inferior da normalidade e dentro do alvo familiar (Z-score: -1,7). Paciente perdeu o seguimento e retornou a unidade aos 17 anos, com estatura de 156cm (Z score: - 2,6), pesando 40,8Kg e IMC 16,7. Retornava

com desenvolvimento puberal completo (estádio puberal de Tanner V) e sem história de terapia de reposição androgênica, micropenis (7,5X2,5cm; Z score: -4,2), uretra tópica e sem fistula após correção cirúrgica e gônadas não palpáveis (esquerda retirada cirurgicamente e direita não manipulada). Dados da avaliação clínica e avaliação hormonal referentes à primeira consulta e seguimento na unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento estão resumidos na Tabela 10.

Durante a investigação etiológica, o paciente realizou cariótipo, cujo resultado foi 46,XY del 10q. O estudo pela metodologia de *array* foi realizado para estabelecer a extensão da perda genômica no braço longo do cromossomo 10, assim como outras possíveis CNVs relacionadas ao fenótipo do paciente.

A análise do SNP *array* revelou a presença de nove CNVs que variavam de 26,3Kb a 11,6Mb de tamanho. Cinco CNVs eram duplicações e quatro eram deleções genômicas sendo uma delas categorizada como patogênica e associada ao fenótipo do paciente, uma outra categorizada como de significado incerto (VUS), e outras sete CNVs consideradas benignas (Tabela 5 e Figura 8).

A deleção observada no cromossomo 10, na posição genômica arr[GRCh37]10q25.3-q26.2(118,087,298-129,753,712)x1 consistia em uma perda de material genômico de aproximadamente 11,6Mb, em uma região contendo 53 genes descritos no OMIM e relacionados a doenças em humanos. A perda de 11,6Mb nesse paciente foi responsável pelo fenótipo sindrômico secundário a uma síndrome de haploinsuficiência de genes contíguos listados na Tabela 6.

Dentre os genes contidos na região cromossômica deletada 10q, os genes *PAX2* (10q24.3-25.1), *GFRA1* (10q25.3), *EMX2* (10q26.11), e *FGFR2* (10q26.12) foram previamente associados às DDS por anormalidades do desenvolvimento gonadal em humanos e um ou vários deles estão provavelmente associados ao fenótipo de subvirilização genital apresentado pelo paciente (BAGHERI-FAM; ONO; LI; ZHAO *et al.*, 2015; BELEZA-MEIRELES; LUNDBERG; LAGERSTEDT; ZHOU *et al.*, 2007; TANNOUR-LOUET; HAN; CORBETT; LOUET *et al.*, 2010). Utilizando o pLI para prever a chance de haploinsuficiência dos genes dessa região associados ao DDS, a haploinsuficiência dos genes *FGFR2* (pLI: 1), *EMX2* (pLI: 0,95), *PAX2* (pLI: 0,67) estão provavelmente associadas ao quadro de disgenesia gonadal desse paciente.

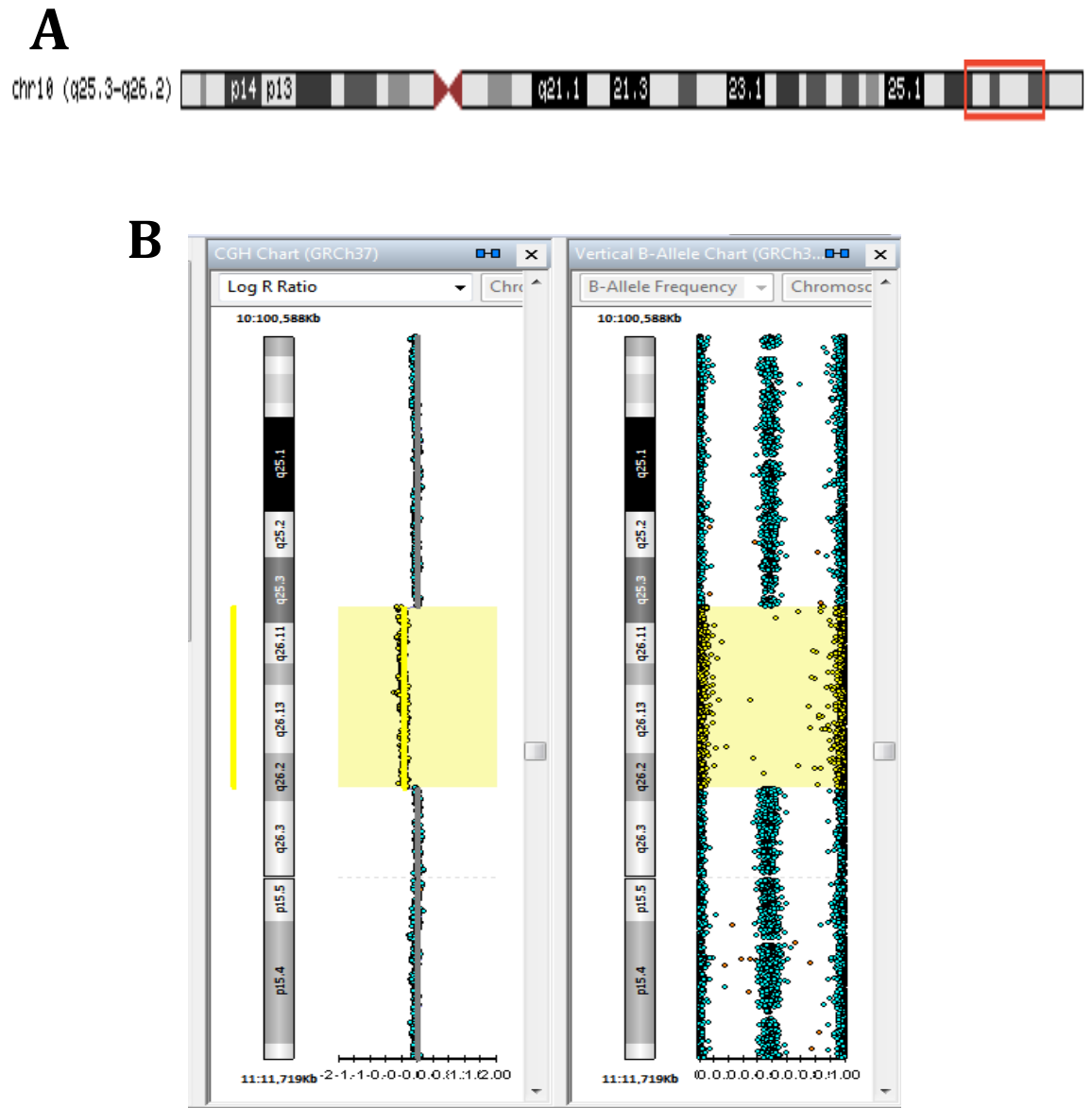
Devido ao grande número de genes perdidos secundário a CNV do paciente, é difícil estabelecer o(s) gene(s) responsável(is) pelo fenótipo de atraso do

neurodesenvolvimento. Deleções grandes na região 10q, assim como a do nosso paciente, estão habitualmente associadas a graus variados de alteração cognitiva e de desenvolvimento psicomotor.

**Tabela 10. Dados da avaliação clínica e hormonais referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia do paciente 7.**

		Primeira avaliação	Última avaliação
<b>Idade cronológica (anos)</b>	5,25	11,5	17,5
<b>Altura (cm) / Escore Z de altura</b>	97,6cm (Z -2,6)	121 (Z -3,5)	156 (Z -2,6)
<b>Altura alvo (cm) / Escore Z de altura alvo</b>	172 (Z -0,68)		
<b>Genitália externa</b>	G1P1	G1P1	G3P4
<b>Tamanho peniano (cm)/Z score</b>	3,0X1,0 (Z -4,1)	4,0X1,5 (Z -2,7)	7,5X2,5 (Z -4,2)
<b>Tamanho testicular</b>	Não palpáveis	Nao palpáveis	Nao palpáveis
<b>Desenvolvimento puberal</b>	P1G1 / Sem ginecomastia	P1G1 / Sem ginecomastia	P5 / Sem ginecomastia
<b>Dismorfismos</b>		Implantação baixa de cabelos e pavilhão auricular, PCA, lábio leporino, hipoacusia, base nasal larga, anormalidade esquelética, hipertelorismo mamário, pés planos, 2º pododactilo curto, prega palmar única, atraso DNPM.	
<b>US pélvica/escrotal</b>	1,8x1,0x0,4cm a D	ND	ND
<b>LH (U/L)</b>			
<b>Valor normal:</b>	<0,6	<0,1	ND
<b>Pré púbere: &lt; 0,3 Homem: 1,7 a 8,6</b>			
<b>FSH (U/L)</b>			
<b>Valor normal:</b>	<1	<0,6	ND
<b>Homem: 1,5 a 12,4</b>			
<b>Testosterona (ng/dL)</b>	<7 → 158*		
<b>Valor normal:</b>	*teste do HCG	<14	ND
<b>Pré púbere: 0 a 40 Homem: 249 a 836</b>			
<b>Estradiol (pg/mL)</b>			
<b>Valor normal:</b>	ND	ND	ND
<b>Pré púbere: &lt;20 Homem: &lt;42,6</b>			

US: ultrassonografia; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio folículo-estimulante; D- direito; E- esquerdo; G1: primeiro estágio do desenvolvimento genital de Tanner; P1: primeiro estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner; G5: quinto estágio do desenvolvimento genital de Tanner; P5: quinto estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner; ND: não disponível.



**Figura 8: Representação da CNV patogênica identificada no paciente 7. (A) A barra vermelha destaca a região cromossômica deletada identificada no estudo de *array* 10q25.3-q26.2. B) Imagem do SNP-*array* demonstrando a redução da intensidade do sinal gerado e da perda do estado heterozigoto.**

### 5.1.5 Paciente 15

Paciente 15 iniciou seguimento no primeiro ano de vida na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo por ter apresentado ao nascimento genitália atípica, caracterizada por hipospádia balânica, criptorquidia bilateral além de bolsa escrotal hipodesenvolvida. Paciente fruto de um casamento não consanguíneo. Genitora referia que durante a gestação apresentou intoxicação por pesticida sem outras intercorrências. Nasceu termo, adequado para idade gestacional (PN 2770g; Z-score: -1,5) e microcefálico (PC: 31cm; Z-score: -2,7). Apresentava também fenótipo sindrômico, além da microcefalia ao nascimento como ptose palpebral bilateral com estrabismo convergente a direita, palato alto, clinodactilia do 5<sup>o</sup> dedo da mão bilateralmente e sindactilia do 2<sup>o</sup> com 3<sup>o</sup> pododáctilo bilateralmente e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor importante.

Durante a investigação diagnóstica, o paciente 15 realizou cariótipo, cujo resultado foi 46,XY sem anormalidades estruturais ou numéricas. Apenas dosagens hormonais basais (LH, FSH, testosterona) foram realizadas na investigação, uma vez que o teste de estímulo prolongado com hCG não estava disponível na época. Os resultados hormonais mostraram valores normais e compatíveis com a idade impúbere do paciente (idade cronológica – 5 anos). Aos 14 anos, o paciente foi submetido a orquipexia bilateral e o estudo histológico dos tecidos testiculares biopsiados no ato cirúrgico revelou testículos disgenéticos bilaterais. Aos 18 anos o paciente realizou orquiectomia bilateral com colocação de próteses testiculares. Os testículos foram removidos cirurgicamente devido disgenesia gonadal e atrofia testicular.

A tomografia de crânio revelou ausência de corpo caloso e os demais exames de imagem (ecocardiograma, USG abdome total e USG pélvico) não mostraram anormalidades. Dados da avaliação clínica e avaliação hormonal referentes à primeira

consulta e seguimento na unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento estão resumidos na Tabela 11.

Por se tratar de paciente portador de disgenesia gonadal 46,XY associado a malformação do sistema nervoso, distúrbios corporais e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor foi indicada a realização do SNP *array*.

A análise do SNP *array* revelou a presença de 15 CNVs, duas categorizadas como patogênicas, sete VUS e seis benignas. As duas CNVs classificadas como patogênicas consistiam em uma duplicação arr[GRCh37] 14q11.2-q12 (19,280,733-25,869,811)x3 de 6,6Mb e uma deleção arr[GRCh37] 21p11.2-q21.3 (14,613,203-27,328,175)x1 de 12,7Mb (Figura 9). Essas duas CNVs são consideradas raras e não foram descritas em indivíduos saudáveis no banco de dados DGV.

CNVs semelhantes foram encontradas em pacientes com alteração do neurodesenvolvimento semelhantes ao apresentado pelo nosso paciente no DECIPHER (alteração do neurodesenvolvimento com espectro autista, estrabismo, clinodactilia). As duas CNVs são ricas em genes descritas no OMIM (107 genes duplicados na região 14q11.2-q12 e 23 genes deletados na região 21p11.2-q21.3) com fenótipos deletérios em humanos quando alteradas. Ambas as CNVs foram categorizadas como patogênicas e associadas ao fenótipo apresentado pelo paciente.

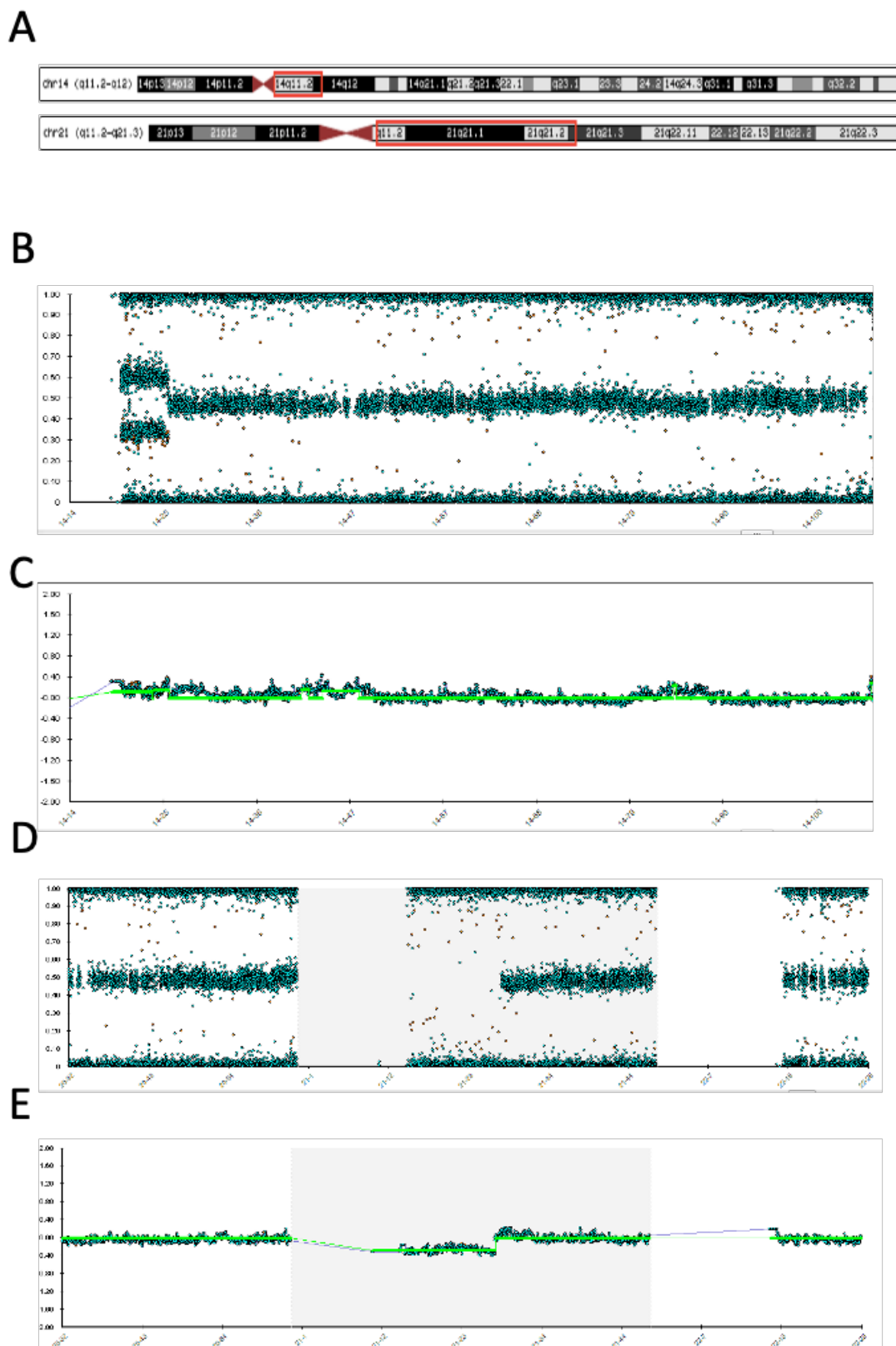
**Tabela 11. Dados da avaliação clínica e hormonais referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia do paciente 15.**

	Primeira avaliação	Seguimento	Última avaliação
<b>Idade cronológica (anos)</b>	11	18,75	25
<b>Altura (cm) / Escore Z de altura</b>	ND	160 (Z-2,29)	162 (Z-2,06)
<b>Altura alvo (cm) / Escore Z de altura alvo</b>	ND		
<b>Genitália externa</b>	hipospádia balânica, criptorquidia bilateral além de bolsa escrotal hipodesenvolvida	Hipospadia balanica, ausência de derivados mullerianos. G5P5	
<b>Tamanho peniano (cm)</b>	3,5X1,0	5,5X2,0cm	7,5X2,5cm
<b>Tamanho testicular</b>	Não palpáveis (inguinais)	1ml bilateral	Próteses testiculares bilateral
<b>Desenvolvimento puberal</b>	G1P1 / Sem ginecomastia	G4P4 / Sem ginecomastia	G5P5 / Sem ginecomastia
<b>Dismorfismos</b>	Agenesia de corpo caloso, microcefalia, adnmp, facies (fronte ampla, ptose palpebral direita palato alto, clinodactilia 5 dedo, estrabismo convergente D, sindactilia 2-3 pododáctilo		
<b>US pélvica/escrotal</b>	Ausencia de derivados mullerianos. Testiculo inguinais bilaterias menores que 1cm3.		
<b>LH (U/L)</b>			
<b>Valor normal:</b>	2,7	28,2	29
<b>Pré púbere: &lt; 0,3 Homem: 1,7 a 8,6</b>			
<b>FSH (U/L)</b>			
<b>Valor normal:</b>	17,5	76	67,4
<b>Homem: 1,5 a 12,4</b>			
<b>Testosterona (ng/dL)</b>			
<b>Valor normal:</b>	279	34	294 *
<b>Pré púbere: 0 a 40 Homem: 249 a 836</b>			

US: ultrassonografia; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio folículo-estimulante; D- direito; E- esquerdo; G1: primeiro estágio do desenvolvimento genital de Tanner; P1: primeiro estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner; G4: quarto estágio do desenvolvimento genital de Tanner;



P4: quarto estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner; G5: quinto estágio do desenvolvimento genital de Tanner; P5: quinto estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner; ND: não disponível.



**Figura 9: Representação da CNV patogênica do paciente 15.** (A) A barra vermelha destaca as regiões cromossômicas 14q11.2-q12 duplicada e 21p11.2-q21.3 deletada identificada no estudo de *array*. (B e C) Representação da duplicação 14q11.2-q12. (D e E) Representação da deleção 21p11.2-q21.3.

### 5.1.6 Paciente 22

Paciente sexo social masculino, iniciou seguimento na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do HC-FMUSP aos 18 anos de idade após transferência do serviço de Genética do hospital Darcy Vargas, no qual era acompanhado desde o nascimento.

O paciente fruto de um casamento não consanguíneo, nasceu a termo porém pequeno para idade gestacional (PIG), com 1730g (Z-score: > -4), 42cm (Z-score: -3,6) de comprimento e microcefalia (PC: 29cm, Z-score: > -4).

Ao nascimento apresentava genitália atípica caracterizada por pênis de tamanho normal (sem medidas disponíveis em prontuário), hipospádia proximal, criptorquidia bilateral além de estenose anal. Alguns dismorfismos faciais, como nariz proeminente (forma de passarinho), olhos proeminentes, palato levemente ogival e dedos dos pés em tridente foram observados. No período neonatal evoluiu sem intercorrências e tratamento cirúrgico não foi necessário para resolução da estenose anal.

O paciente apresentou atraso do desenvolvimento cognitivo e de fala, e dificuldade de aprendizado, não aprendeu a ler ou escrever, porém com desenvolvimento motor adequado. Até os 16 anos, não apresentava desenvolvimento puberal espontâneo, quando foi iniciada reposição hormonal com testosterona (exames da época não disponíveis). Devido ao comportamento agressivo apresentado pelo paciente, a medicação foi suspensa segundo relato da cuidadora. A correção cirúrgica genital foi iniciada aos 17 anos, com a realização de ortofaloplastia e orquidopexia bilateral e biópsia gonadal bilateral, cujo estudo histológico revelou tecido testicular bilateral com fibrose intersticial e espermatogênese ausente.

Na investigação de outras malformações associadas, evidenciou-se a presença de rim direito ectópico e refluxo vesicoureteral de primeiro grau em rim esquerdo. O diagnóstico de deficiência parcial dos fatores VII e X da coagulação foi também estabelecido no paciente, porém sem repercussões clínicas. Escoliose de coluna cervical e lombar foi observada no RX de corpo inteiro e no TC de crânio não foram identificadas anormalidades. Ao completar 18 anos foi encaminhado e iniciou seguimento no HC-FMUSP. Durante a investigação genética, o paciente realizou cariótipo na unidade hospitalar de origem, cujo resultado foi 46,XY r(13)(p11.2q34). O estudo pela técnica de *array* CGH foi realizado para estabelecer a extensão da

perda genômica no braço curto do cromossomo 13, assim como avaliar outras possíveis CNVs relacionadas ao fenótipo do paciente. Dados da avaliação clínica e avaliação hormonal referentes à primeira consulta e seguimento na unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento estão resumidos na Tabela 12.

A análise do *array* identificou 5 CNVs, 4 duplicações e uma deleção (Tabela 5). Dessas alterações, a deleção na região terminal do cromossomo 13q33.1q34 (104,182,489-115,107,733)x1 de 10,9Mb foi categorizada como patogênica (Figura 10). As outras 4 CNVs encontradas foram consideradas benignas (2 CNVs) e VUS (2 CNVs).

A possibilidade de mosaïcismo de baixo grau para a região cromossômica 13q33.1q34 é sugerida no *array* pela intensidade do sinal gerado na leitura do *array*. Uma duplicação no mesmo cromossomo 13 na posição citogenômica 13q33.1, medindo 1,4Mb imediatamente anterior a deleção, foi detectada sugerindo a existência de um rearranjo cromossômico complexo.

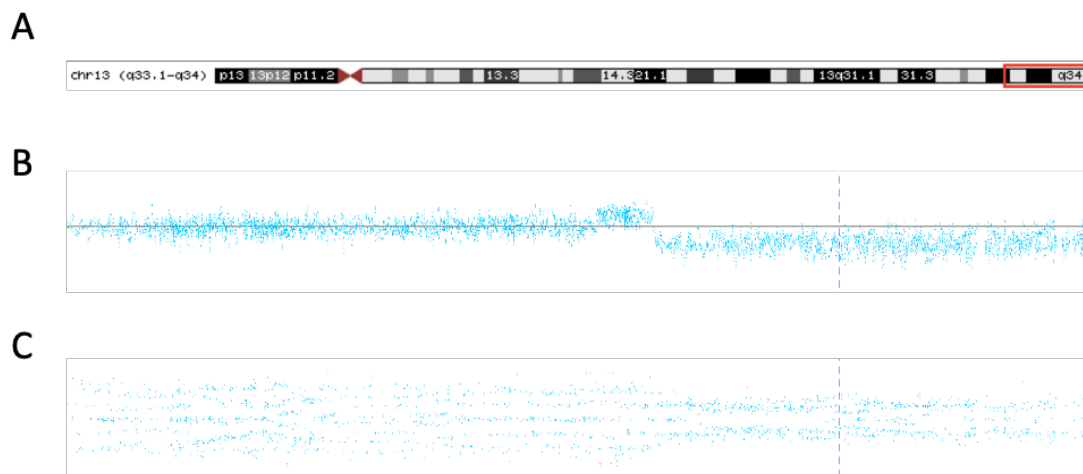
A deleção na região terminal do cromossomo 13q33 não foi relatada em nenhum indivíduo saudável descrito no DGV. A região 13q deletada contém 32 genes OMIM, que já foram associados em humanos a fenótipos patogênicos. Deleções na região 13q sobrepostas à identificada no paciente 22 foram relatadas na literatura em pacientes com fenótipos semelhantes caracterizando uma síndrome de deleção de genes contíguos. Portanto, essa deleção foi considerada patogênica e associada ao fenótipo sindrômico apresentado pelo paciente (Tabela 6).

Dentre as possíveis causas de DDS que poderiam explicar o caso desse paciente, a haploinsuficiência do gene *EFNB2* (*pLI 0,99*) situado na região 13q33.1q34 deletada foi relacionado como um gene candidato ao fenótipo de anomalia anorretal e genitourinária apresentada pelo paciente. Este gene codifica um membro da família efrina, que compreende uma subfamília de receptores proteína-tirosina kinases e tem importância no desenvolvimento do sistema genitourinário embrionário. Em camundongos, variantes patogênicas no gene *Efn2* foram associadas a fenótipos de malformação anorretal e hipospádia, semelhante ao do nosso paciente (LÉVY; HAYE; MARZILIANO; CASU *et al.*, 2018).

**Tabela 12. Dados da avaliação clínica e hormonais referentes à primeira consulta e seguimento na Endocrinologia do paciente 22.**

	Primeira avaliação	Última avaliação
<b>Idade cronológica (anos)</b>	3,16	18
<b>Altura (cm) / Escore Z de altura</b>		148 (Z -4,7)
<b>Altura alvo (cm) / Escore Z de altura alvo</b>	ND	
<b>Genitália externa</b>	Micropenis, curvatura peniana, criptorquidia bilateral , hipospadia perineoescrotal e anomalia anorectal	
<b>Tamanho peniano (cm) Z score</b>	ND	10X4 (Z -2,8)
<b>Tamanho testicular (cm)</b>	ND	2X1 bilateral
<b>Desenvolvimento puberal</b>	G1P1 / Sem ginecomastia	G4P4 / Sem ginecomastia
<b>Dismorfismos</b>	Rim direito ectópico, RVU esquerda grau 1, microcefalia, ADNPM, atraso puberal , def parcial X e VII fator de coag; escoliose sinistroconcavacervical	
<b>US pélvica/escrotal</b>	Sem derivados mullerianos	
<b>LH (U/L)</b>		
<b>Valor normal:</b>	<0,1	7,9
<b>Pré púbere: &lt; 0,3 Homem: 1,7 a 8,6</b>		
<b>FSH (U/L)</b>		
<b>Valor normal:</b>	0,8	5,9
<b>Homem: 1,5 a 12,4</b>		
<b>Testosterona (ng/dL)</b>		
<b>Valor normal:</b>	<10	256
<b>Pré púbere: 0 a 40 Homem: 249 a 836</b>		

US: ultrassonografia; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio folículo-estimulante; D- direito; E- esquerdo; G1: primeiro estágio do desenvolvimento genital de Tanner; P1: primeiro estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner; G4: quarto estágio do desenvolvimento genital de Tanner; P4: quarto estágio do desenvolvimento pelos genitais de Tanner.



**Figura 10: Representação da CNV patogênica do paciente 22.** (A) A barra vermelha destaca a região cromossômica deletada 13q33.1q34 identificada no estudo de *array*. B) Imagem do *SNP-array* demonstrando uma duplicação (VUS) seguida de uma deleção (patogênica) em mosaïcismo com redução da intensidade do sinal gerado e da perda do estado heterozigoto.

## 6. DISCUSSÃO

Passados 60 anos do início do uso da técnica de cariotipagem em sangue periférico e a descoberta das primeiras aberrações cromossômicas numéricas, um grande avanço ocorreu nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico. Porém, apesar da disponibilidade das técnicas de citogenética molecular como os *arrays* genômicos de alta precisão e técnicas de sequenciamento paralelo em larga escala (exoma e genoma), o diagnóstico molecular das diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual continuam sendo um desafio na prática clínica diária.

O diagnóstico molecular definitivo de pacientes com DDS acompanhados em centros de pesquisa especializados, utilizando essas novas técnicas, é estabelecido em cerca de 40-50% dos casos (AMARILLO; NIEVERA; HAGAN; HUCHTHAGOWDER *et al.*, 2016; MUNGER; CAPEL, 2012). A detecção de variações do número de cópias genômicas (CNVs) associadas às DDS tem auxiliado no diagnóstico etiológico de casos sindrômicos e esporádicos (AMARILLO; NIEVERA; HAGAN; HUCHTHAGOWDER *et al.*, 2016; HARRISON; GRANBERG; KEAYS; HILL *et al.*, 2014; WHITE; OHNESORG; NOTINI; ROESZLER *et al.*, 2011).

Apesar do uso das plataformas de *array* genômico na pesquisa e na clínica terem se tornado mais frequentes, principalmente na avaliação de pacientes com fenótipo de autismo e déficit intelectual, pouco se sabe sobre a real contribuição das CNVs identificadas para o fenótipo dos indivíduos estudados. A maioria dos estudos utilizando a técnica de *array* se limitam à descrição de grandes CNVs, que ultrapassam os 300-500Kb. Pequenas CNVs com tamanho entre 5-200Kb habitualmente não são relatadas, e são categorizadas como benignas ou variantes de significado incerto (VUS), e cuja contribuição para a determinação do fenótipo de vários pacientes permanece inconclusiva (HOLLENBECK; WILLIAMS; DRAZBA; DESCARTES *et al.*, 2017)

Neste estudo, todas as CNVs identificadas pela técnica de *array* foram avaliadas cuidadosamente quanto aos critérios de patogenicidade. A menor CNV identificada tinha apenas 2,8Kb e foi categorizada como uma variante benigna utilizando-se as ferramentas de predição *in silico* como (<http://cnvcalc.clinicalgenome.org/cnvcalc/>) além de comparação com as informações

depositadas em bancos de dados internacionais públicos (DGV, CLINVAR, DECIPHER, OMIM).

A maioria das CNVs encontradas neste estudo foram categorizadas como benignas (155 CNVs / 74,5%) ou VUS (65 CNVs / 31,2%). Estabelecer o caráter patogênico ou benigno de uma VUS representa atualmente um desafio na análise de *arrays* genômicos. A crescente quantidade de informações disponibilizadas nos diferentes bancos de dados permitirá no futuro estabelecer mais precisamente a relação entre determinada CNV e uma possível condição patogênica (NOWAKOWSKA, 2017).

A interpretação das contribuições das nove CNVs raras identificadas e categorizadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas para o fenótipo de DDS 46,XX e DDS 46,XY sindrômico, serão discutidas detalhadamente a seguir baseado nas informações disponíveis em bancos de dados públicos e ferramentas de bioinformática para caracterização do conteúdo gênico das CNVs.

## 6.1 Paciente 2

A DDS 46,XX testicular é uma condição rara, que afeta 1:20.000-30.000 nascidos vivos (GUELLAEN; CASANOVA; BISHOP; GELDWERTH *et al.*, 1984; JARRAH; EL-SHANTI; KHIER; OBEIDAT *et al.*, 2000). A translocação do *SRY* para o cromossomo X ou um autossomo de origem paterna constitui o evento responsável pela diferenciação da gônada bipotencial fetal em testículo na maioria dos pacientes DDS 46,XX testicular avaliados (>80%) (CHEN; DING; WEI; LI, 2014; CHIANG; WU; WU; HWANG, 2013; GRINSPON; REY, 2016; HAINES; HUGHES; CORBETT; SHAW *et al.*, 2015).

Habitualmente, os pacientes com DDS testicular 46,XX *SRY* positivo apresentam genitália masculina típica ao nascimento e são geralmente diagnosticados quando adolescentes ou adultos jovens devido a quadro de hipogonadismo, ginecomastia ou infertilidade (VORONA; ZITZMANN; GROMOLL; SCHURING *et al.*, 2007). Duplicações dos genes *SOX9* e *SOX3* ou rearranjos das regiões regulatórias desses genes foram relacionados menos frequentemente ao fenótipo de genitália masculina normal em pacientes DDS testicular 46,XX *SRY* negativos (GRINSPON; REY, 2019).



Os pacientes com DDS testicular 46,XX *SRY* negativo usualmente apresentam graus variados de atipia genital e tendem a ser diagnosticados mais precocemente (GRINSPON; REY, 2016). Várias etiologias moleculares já foram relacionadas a esta condição, caracterizando o excesso de expressão de genes masculinizantes (*SOX9*, *SOX3*, *SOX10*) ou a redução da expressão de genes feminilizantes (*WNT4*, *RSP01*) durante o processo de determinação da gônada embrionária (GRINSPON; REY, 2019).

No paciente 2, a realização do cariótipo para a investigação de síndrome genética e atraso do DNPM permitiu o diagnóstico precoce de DDS testicular 46,XX não suspeito inicialmente, uma vez que o paciente não apresentava nenhuma anormalidade genital. Além disso, os indivíduos portadores de DDS testicular habitualmente não apresentam dismorfismos faciais ou atraso mental. Essa somatória de características fenotípicas associada à hipótese diagnóstica de DDS testicular suscitou a realização do *array*, que foi capaz de confirmar além da presença de material do braço curto do cromossomo Y, uma segunda alteração cromossômica responsável pelo fenótipo sindrômico do paciente.

A síndrome da deleção 3q29 (OMIM - #609425) é caracterizada por atraso mental, com comprometimento principalmente da fala, associado a dismorfismos faciais diversos, como: face alongada e afilada, feltro labial superior pequeno, ponte nasal baixa e dedos alongados podendo ocorrer redução da mobilidade. Baixo peso ao nascer e baixo ganho pondero estatural também podem estar presentes. Algumas outras características clínicas podem ser observadas nessa síndrome, devido à grande combinação possível de genes afetados (MURPHY; LINDSEY BURRELL; CUBELLS; ESPANA *et al.*, 2018; WILLATT; COX; BARBER; CABANAS *et al.*, 2005). A base genética do comprometimento cognitivo presente em todos os pacientes com 3q29 não está bem estabelecida. Haploinsuficiência dos genes *DLG1* (pLI = 0,99) e *PAK2* (pLI = 0,97) podem estar associados a esse quadro já que são genes homólogos a *DLG3* e *PAK3* respectivamente, genes encontrados no cromossomo X e com correlação bem estabelecida com atraso cognitivo na literatura (DIGILIO; BERNARDINI; MINGARELLI; CAPOLINO *et al.*, 2009; MURPHY; LINDSEY BURRELL; CUBELLS; ESPANA *et al.*, 2018; QUINTERO-RIVERA; SHARIFI-HANNAUER; MARTINEZ-AGOSTO, 2010; WILLATT; COX; BARBER; CABANAS *et al.*, 2005).

O nosso paciente apresentava comprometimento cognitivo com atraso de fala e do aprendizado conforme descrito na síndrome de deleção 3q29 e em diversos pacientes relatados no banco de dados do DECIPHER sob o registro 341487; 275471; 314365; 331452; 401690 e 402174. Nesses indivíduos reportados no DECIPHER, o tamanho da deleção girava em torno de 1,7Mb e estava contida dentro da região deletada que foi identificada no nosso paciente. Alguns desses pacientes descritos no DECIPHER apresentavam alterações dismórficas faciais semelhantes às apresentadas pelo paciente 2, como a alteração do pavilhão auricular (401690). Dois dos indivíduos relatados no DECIPHER, e inscritos sob os números 295028 e 400989, também apresentavam quadro de epilepsia como o paciente 2.

Devido ao grande número de genes deletados (Tabela 6) é difícil estabelecer a contribuição de cada um deles para o fenótipo apresentado pelo paciente 2. No entanto, podemos relacionar e atribuir à deleção 3q29 identificada nesse paciente com o seu fenótipo sindrômico e atraso mental e na fala, associado à condição de DDS testicular 46,XX *SRY* positivo.

## 6.2 Paciente 5

A causa da DDS apresentada pela paciente 5 pode ser atribuída à presença do fragmento do cromossomo Yp11.31 de 7,1MB contendo o gene *SRY*, responsável pelo desenvolvimento testicular nessa paciente. A produção hormonal testicular determinou a regressão dos derivados Mullerianos porém foi insuficiente para a completa virilização da genitália externa na paciente 5.

O indivíduo com DDS testicular 46,XX *SRY* + habitualmente se apresenta com genitália masculina normal, ao contrário do DDS testicular 46,XX *SRY* - que frequentemente apresenta-se com genitália atípica, sugerindo que outro fator testicular seja o responsável pelo quadro clínico. Apesar de raro, há alguns relatos na literatura de indivíduos com DDS 46,XX testicular *SRY*+ com atipia genital (GRINSPON; REY, 2016; 2019; GUELLAEN; CASANOVA; BISHOP; GELDWERTH *et al.*, 1984; MAJZOUB; ARAFA; STARKS; ELBARDISI *et al.*, 2017; MOHAMMADPOUR LASHKARI; TOTONCHI; ZAMANIAN; MANSOURI *et al.*, 2017; VORONA; ZITZMANN; GROMOLL; SCHURING *et al.*, 2007; WANG; LIU; YANG; CHEN *et al.*, 2009).

Em 1999, Kusz et al. relataram a presença de atipia genital em indivíduos 46,XX *SRY*+ com diagnóstico de DDS ovário-testicular ou DDS testicular. Nesses pacientes a região translocada do *SRY* estava localizada no cromossomo X, que sofreu inativação seletiva, o que poderia justificar a presença de atipia genital mesmo na presença do gene *SRY* assim como a persistência de tecido gonadal ovariano naqueles com diagnóstico de DDS ovotesticular (FECHNER; ROSENBERG; STETTEN; CARGILE *et al.*, 1994; KUSZ; KOTECKI; WOJDA; SZARRAS-CZAPNIK *et al.*, 1999; SCHEMPP; MÜLLER; SCHERER; BOHLANDER *et al.*, 1989). Em nosso paciente, uma possível explicação para o desenvolvimento de genitália atípica em um paciente DDS 46,XX *SRY*+ seria também presença desse material de Y em um dos cromossomos X inativados parcialmente.

A paciente 5 apresenta também uma grande deleção localizada na região Xp22.33 medindo 9MB. Essa deleção está localizada numa região que contém 26 genes OMIM (Tabela 6) relacionados a diversas doenças em humanos. Entre elas, destaca-se que deleções nessa região foram associadas à síndrome de Aicardi em diversos relatos na literatura (AICARDI J; A; DONNENFELD; PACKER; ZACKAI; CHEE *et al.*, 1989; EBLE; SUTTON; SANGI-HAGHPEYKAR; WANG *et al.*, 2009; LEJEUNE; BERGER; RETHORE; ARCHAMBAULT *et al.*, 1964; NEIDICH; NUSSBAUM; PACKER; EMANUEL *et al.*, 1990; ROPERS; ZUFFARDI; BIANCHI; TIEPOLO, 1982).

A síndrome de Aicard (OMIM- 304050) foi descrita pela primeira vez em 1965, como uma patologia que afetava o neurodesenvolvimento principalmente em indivíduos XX (AICARDI; CHEVRIE; ROUSSELIE, 1969; AICARDI J; A). Esta rara síndrome afeta aproximadamente 1:100.000 nascidos vivos, é classicamente composta por uma tríade: Agenesia/hipoplasia de corpo caloso, alterações corioretinianas e espasmos infantis (KRONER; PREISS; ARDINI; GAILLARD, 2008; VAN DEN VEYVER; ZOGHBI, 2002; WONG; SUTTON, 2018). Nossa paciente apresenta todas as características dessa síndrome: agenesia do corpo caloso, malformação ocular e quadro de epilepsia de difícil controle e de início precoce.

A agenesia de corpo caloso (ACC) é uma das malformações de sistema nervoso central mais comuns podendo ocorrer de forma isolada ou não. Quando comparamos os pacientes com ACC com pacientes com síndrome de Aicardi, aqueles frequentemente não apresentam acometimento ocular assim como menor

comprometimento de neurodesenvolvimento como aquisição de fala e psicomotricidade em relação aos pacientes com Aicardi. A apresentação de convulsão também é mais frequente no Aicardi e de início mais precoce (GOVIL-DALELA; KUMAR; AGARWAL; CHUGANI, 2017).

O padrão de herança genética relacionado à síndrome de Aicardi persiste não esclarecido, porém o padrão de herança ligada ao X foi sugerido em diversos estudos, apontando o *locus* na região Xp22 como o mais comumente associado à síndrome (BALLABIO; ANDRIA, 1992).

A síndrome de Aicardi afeta quase que exclusivamente indivíduos 46,XX, tendo sido descrito também em indivíduos 47,XXY. A hipótese de que variantes *de novo* no cromossomo X em indivíduos XY causariam condições incompatíveis com a vida e abortamento fetal precoce (WONG; SUTTON, 2018). A hipótese de que a inativação seletiva do cromossomo X tanto poderia estar envolvida com a síndrome de Aicardi como apontaria para a doença ser ligada a alterações no cromossoma X tem sido proposta por alguns autores (NEIDICH; NUSSBAUM; PACKER; EMANUEL *et al.*, 1990). Inativação seletiva do X foi encontrada principalmente em pacientes com fenótipos neurológicos mais graves da doença quando comparados com indivíduos sem inativação seletiva (EBLE; SUTTON; SANGI-HAGHPEYKAR; WANG *et al.*, 2009).

No banco de dados do DECIPHER são relatados outros dois pacientes (283802 e 402426) com deleções menores (1,3Mb e 6,3Mb respectivamente) e contidas na região deletada do paciente 5, e que apresentam fenótipos muito semelhantes, caracterizados por hipoplasia de corpo caloso e hidrocefalia/ventriculomegalia além de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor importante. O indivíduo inscrito sob o número 283802 também possuía atrofia/hipoplasia do nervo óptico além de alteração do desenvolvimento da genitália externa com micropênis.

O quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico da nossa paciente, caracterizado pela ausência de desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e confirmado após dosagens laboratoriais de gonadotrofinas inapropriadamente normais e testosterona e estradiol baixos, não encontrou explicações após a análise do array. A perda de uma cópia do *KALI* encontrado no array não é por si só capaz de gerar hipogonadismo. Sequenciamento por painel de genes selecionados para

hipogonadismo que incluía o *KALI* foi realizado para complementar a investigação e não resultou em nenhum achado patogênico ou provavelmente patogênico em nenhum dos genes sabidamente envolvidos com hipogonadismo hipogonadotrófico.

No caso do paciente número 5, a realização do *array* permitiu o diagnóstico da síndrome de Aicardi pela deleção Xp22.33 e contribuiu também para o diagnóstico da causa do atipia genital, como provável DDS testicular *SRY+*.

### 6.3 Paciente 6

A catarata congênita afeta 40 crianças para cada 100.000 nascidas vivas no mundo desenvolvido (GRAW, 2004). É importante notar que, em países em desenvolvimento, pode haver uma grande contribuição de causas infecciosas pré e perinatais como causas de catarata congênita.

O gene *PITX3* está localizado no cromossomo 10q24.32, é homólogo ao gene *Pitx3* em camundongos, e é expresso em diversos tecidos, principalmente em células neuronais, hipófise e olho. Variantes patogênicas no *PITX3* e *Pitx3* foram associadas a malformações oculares e retinianas, e em humanos mais frequentemente à presença de catarata e malformações do seguimento anterior do olho (AKULA; PARK; WESTMAYS, 2018; BURDON; MCKAY; WIRTH; RUSSELL-EGGIT *et al.*, 2006; CHEN; KANG; TANG; GAO, 2017; ZAZO SECO; PLAISANCIE; LUPASCO; MICHOT *et al.*, 2018).

BIDINOST *et al.* descreveu uma família libanesa pacientes com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e catarata congênita associada a mutação do gene *PITX3* (BIDINOST; MATSUMOTO; CHUNG; SALEM *et al.*, 2006). Reforçando o potencial patogênico da deleção do gene *PITX3* no fenótipo de malformação ocular, identificamos na literatura o relato de um paciente com ptose palpebral (DECIPHER número 392832; tamanho da deleção: 19Mb) e outro com hipermetropia associado a estrabismo (DECIPHER número 264272; tamanho da deleção: 834Kb).

Os padrões de herança autossômico dominante, autossômico recessivo e com penetrância incompleta foram identificados nos portadores de variantes patogênicas no *PITX3* e malformações oculares.

Na avaliação dos *sites* de predição *in silico*, nenhuma CNV na região contendo o gene *PITX3* foi observada em indivíduos saudáveis. O *PITX3* é um gene com possibilidade de sofrer haploinsuficiência com escore de pLI = 0,813.

Levando em consideração a ausência de CNVs no gene *PITX3* associados a indivíduos saudáveis e a presença de CNV previamente reportada nesse gene com fenótipo de malformação ocular, a variante identificada na região 10q24.32 foi considerada como provavelmente responsável pelo fenótipo oftalmológico do paciente 6.

Por outro lado, não relacionamos nenhuma das CNVs identificadas na análise do *array* desse paciente, como potencial causadora do fenótipo de DDS apresentado pelo paciente.

O estudo por sequenciamento em larga escala utilizando painel customizado de genes associados a DDS revelou a variante c.C1220G; p.P407R no gene *GATA4* classificada segundo os critérios do ACMG como VUS, e portanto não pode explicar a causa do DDS do paciente. A variante era herdada e de origem materna. Estudos complementares estão sendo ainda realizados.

#### 6.4 Paciente 7

A síndrome de deleção 10q26 (OMIM #609625) é descrita como uma síndrome de deleção de genes contíguos, cujos portadores apresentam fenótipos bastante heterogêneos. Dismorfismos faciais diversos, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e comportamental, baixa estatura, malformações de extremidades, malformações cardíacas e genitourinárias em graus variados são características apresentadas pelos pacientes (IRVING; HANSON; TURNPENNY; BREWER *et al.*, 2003; LEWANDOWSKI; KUKOLICH; SEARS; MANKINEN, 1978; SHAPIRO; HANSEN; PASZTOR; DILIBERTI *et al.*, 1985).

Diversas malformações genitourinárias podem ser observadas em portadores de deleção 10q. Graus variados de genitália atípica também podem estar presentes, variando de micropenis, criptorquidia até disgenesia gonadal completa XY (WILKIE; CAMPBELL; DAUBENEY; GRANT *et al.*, 1993; YATSENKO; KRUER; BADER; CORZO *et al.*, 2009).

Na revisão de Tanabe et al. publicada em 1999, 25 pacientes com a síndrome da deleção 10q26 são descritos e a presença de malformações genitourinárias com refluxo vesicoureteral foram frequentemente observadas. Criptorquidia foi observada em 83% dos indivíduos afetados do sexo masculino (TANABE; AKIBA; KATOH; SATOH, 1999). Na região cromossômica 10q estão localizados alguns genes previamente relacionados ao desenvolvimento gonadal e genital em humanos e/ou em modelos animais, tais como *PAX2* (10q24.3-25.1), *GFRA1* (10q25.3), *EMX2* (10q26.11), e *FGFR2* (10q26.12) (CHEN; CHERN; WANG; HSUEH *et al.*, 2005; CHUNG; HWA; TSENG; SHYU *et al.*, 1998; MIYAMOTO; YOSHIDA; KURATANI; MATSUO *et al.*, 1997; OGATA; MUROYA; SASAGAWA; KOSHO *et al.*, 2000; WILKIE; CAMPBELL; DAUBENEY; GRANT *et al.*, 1993).

O papel do *Fgfr2/Fgf9* na determinação testicular de camundongos está bem demonstrado. *Fgfr2* é o receptor primordial do *Fgf9*, que através da sua ligação ao *Fgfr2* induz a proliferação das células epiteliais celômicas levando a diferenciação e a manutenção das células de Sertoli. *Fgfr2/Fgf9* atuam no estímulo e manutenção dos níveis transcricionais de *Sox9* (Figura 2), participando dessa maneira da determinação e diferenciação da gônada bipotencial em testículo, atuando em diversas etapas do processo como a migração de células do mesonefron, proliferação de células progenitoras na gônada, diferenciação das células de Sertoli e formação do cordão sexual (COLVIN; GREEN; SCHMAHL; CAPEL *et al.*, 2001; KIM; BINGHAM; SEKIDO; PARKER *et al.*, 2007).

Em camundongos foi demonstrado que a perda da função por variante patogênica em homozigose no *Fgfr2* comprometeu a diferenciação testicular normal causando uma desorganização da arquitetura gonadal com disgenesia gonadal associada (COLVIN; GREEN; SCHMAHL; CAPEL *et al.*, 2001; KIM; BINGHAM; SEKIDO; PARKER *et al.*, 2007).

Variantes patogênicas no *FGFR2* em humanos já foram descritas associadas a diversas síndromes. Perda ou ganho de função da proteína *FGFR2* podem resultar em fenótipos completamente diferentes, como a síndrome lácrimo-aurículo-dento-digital (LADD) além de fenótipos sindrômicos associados a presença de craniossinostose (síndrome de Crouzon, Alpert, Pfeiffer e Antley-Bixler) (KAN; ELANKO; JOHNSON; CORNEJO-ROLDAN *et al.*, 2002; REARDON; WINTER; RUTLAND;

PULLEYN *et al.*, 1994; SHAMS; ROHMANN; ESWARAKUMAR; LEW *et al.*, 2007).

Bagheri-Fam S. e colaboradores descreveram uma variante patogênica em heterozigose no gene *FGFR2* relacionada ao fenótipo de craniossinostose e disgenesia gonadal XY. Este relato, embora único, reforça o envolvimento do *FGFR2* na determinação testicular em humanos (BAGHERI-FAM; ONO; LI; ZHAO *et al.*, 2015). A variante alélica p.Ser453Leu em heterozigose no gene *FGFR2* foi encontrada em duas irmãs com disgenesia gonadal parcial XY sem fenótipo de craniossinostose (GOMES; LERÁRIO; MACHADO; MORAES *et al.*, 2018). Além dessa variante no *FGFR2*, as duas irmãs também possuíam uma outra variante no gene *MAP3K1*, sugerindo um caráter digênico da doença. Essa variante foi considerada provavelmente patogênica pelos sites de predição *in silico* e reforçam o envolvimento do *FGFR2* na patogênese da disgenesia gonadal também em humanos. Existem também evidências na literatura da associação entre SNPs no gene *FGFR2* e a presença de hipospádia em humanos (BELEZA-MEIRELES; LUNDBERG; LAGERSTEDT; ZHOU *et al.*, 2007).

Microdeleções no braço curto do cromossomo 10, região que contem o gene *FGFR2*, também foram relacionadas a casos de hipospádia e disgenesia gonadal 46,XY (BELEZA-MEIRELES; LUNDBERG; LAGERSTEDT; ZHOU *et al.*, 2007; TANNOUR-LOUET; HAN; CORBETT; LOUET *et al.*, 2010).

Tannour-Louet et al. utilizaram a técnica de *array*-CGH na avaliação de 116 crianças com DDS sem diagnóstico etiológico estabelecido. Esse estudo permitiu a identificação da presença de variantes de relevância clínica em 21,5% dos pacientes. Em um dos pacientes dessa coorte foi identificada uma deleção na região 10q26.1q26.3, medindo 57,4Mb, que se sobrepõe à deleção encontrada em nosso paciente. Em ambos os pacientes, a função do *FGFR2* e outros genes contíguos foi comprometida e provavelmente estava associada ao fenótipo de genitália atípica. Outras características clínico-laboratoriais do paciente relatado por Tannour-Louet et al., além da presença de genitália atípica, não estavam disponíveis no estudo.

Tosur M et al. também descreveram um paciente com deleção 10q25.3q26.13 medindo 8,2MB que apresentava genitália atípica ao nascimento, caracterizada por micropenis, hipospádia e criptorquidia bilateral, associada à persistência dos derivados mullerianos. O paciente também apresentava malformação anorretal com fístula perineal, dismorfismos faciais como micrognatia, hipertelorismo ocular, palato



ogival, base nasal achatada e hipoplasia ungueal além de malformação sacral e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (TOSUR; GEARY; MATALON; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2015). Como essa região compreendia o *FGFR2*, Tosur *et al.* atribuiu a ele a causa do DDS apresentado pelo paciente relatado. Essa deleção também continha outro gene não explorado por Tosur, o *EMX2*, que constitui um gene de interesse tanto para o desenvolvimento gonadal quanto do assoalho pélvico (KUSAKA; KATOH-FUKUI; OGAWA; MIYABAYASHI *et al.*, 2010; MIYAMOTO; YOSHIDA; KURATANI; MATSUO *et al.*, 1997).

O gene *EMX2*, fortemente relacionado ao desenvolvimento urogenital, está localizado na região cromossômica 10q deletada no *array* do paciente 7. Em camundongos, a expressão do *Emx2* ocorre no cordão nefrogênico, ductos de Wolff e nos mesonefros entre o 8º e 10º dia pós concepção. Em humanos, o *EMX2* é intensamente expresso no telencéfalo dorsal, no neuroepitélio olfatório e no sistema urogenital.

Camundongos *knockout* para o gene *Emx2* apresentam agenesia de rins, ureteres, gônadas e ausência de desenvolvimento genital confirmando a importância desse gene no desenvolvimento do sistema urogenital (KUSAKA; KATOH-FUKUI; OGAWA; MIYABAYASHI *et al.*, 2010; MIYAMOTO; YOSHIDA; KURATANI; MATSUO *et al.*, 1997).

Piard J *et al.* em 2014 relatou o caso de um indivíduo 46,XY com deleção terminal 10q25.3-26.12 de 3,8MB. Esse paciente nasceu com genitália atípica caracterizada por micropênis (1,2cm), hipospádia, escroto bífido e criptorquidia bilateral associada a disgenesia gonadal. Ele apresentava também atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, escoliose e pescoço curto, sem outros distúrbios (PIARD; MIGNOT; ARBEZ-GINDRE; AUBERT *et al.*, 2014). Nesse estudo, Piard *et al.* comparou as regiões deletadas do braço curto do cromossomo 10 identificadas em vários pacientes com fenótipo de atipia genital e estabeleceu a menor região cromossômica associada à condição de DDS sugerindo o *EMX2* como o gene responsável pelo fenótipo (MILLER; NANCE; WOHLER; HOOVER-FONG *et al.*, 2009; PIARD; MIGNOT; ARBEZ-GINDRE; AUBERT *et al.*, 2014; YATSENKO; KRUEER; BADER; CORZO *et al.*, 2009).

A haploinsuficiência dos genes *FGFR2* e/ou *EMX2* podem ter levado a condição de malformação urogenital observada no paciente 7, acarretando genitália atípica e disgenesia gonadal.

Surdez neurossensorial foi diagnosticada no paciente 7 após sua recuperação de uma meningite neonatal e a origem da surdez foi associada a uma sequela do processo infeccioso. Esta associação foi estabelecida, uma vez que a relação entre estas duas condições é observada com relativa frequência na prática clínica de neonatologia. Porém, é possível que no desenvolvimento da surdez haja o envolvimento de um fator genético. Na região 10q deletada identificada no *array* do paciente 7 estão localizados dois genes, *HMX3* (OMIM 613380) e *HMX2* (OMIM 600647), ambos associados à determinação e morfogênese do vestibulo e ouvido interno em camundongos (IRVING; HANSON; TURNPENNY; BREWER *et al.*, 2003; WANG; GRIMMER; VAN DE WATER; LUFKIN, 2004). Indivíduos com hemizigose dos genes *HMX2* e *HMX3* e com fenótipo de surdez neurossensorial foram descritos na literatura e corroboram para a hipótese de que a haploinsuficiência desses genes possa estar relacionada à presença de surdez neurossensorial em nosso paciente; apesar de não ser possível descartar definitivamente o quadro de meningite neonatal como a causa da surdez (MILLER; NANCE; WOHLER; HOOVER-FONG *et al.*, 2009; SANGU; OKAMOTO; SHIMOJIMA; ONDO *et al.*, 2016; WANG; GRIMMER; VAN DE WATER; LUFKIN, 2004). O pLI para o gene *HMX3* é de 0,92 e o do *HMX2* é de 0, o que sugere que o *HMX3* poderia sofrer haploinsuficiência não tolerando a perda de uma cópia genômica.

Em nosso paciente, a deleção comprometeu pelo menos 53 genes OMIM contidos nessa região. Vinte e seis doenças/síndromes descritas na base de dados OMIM foram associadas ao comprometimento de pelo menos um dos genes contidos nessa região. A contribuição de cada um desses genes para o fenótipo do nosso paciente é difícil de ser estabelecida, mas essa CNV foi categorizada como patogênica e foi associada ao fenótipo sindrômico apresentado.

Com base nos dados disponíveis na literatura, sugerimos que nesse paciente a causa da DDS pode ser atribuída à haploinsuficiência do *FGFR2* e/ou do *EMX2*, e o caráter digênico deve ser valorizado. Nosso achado corrobora para o papel dessa região cromossômica e em especial desses dois genes na formação do aparelho genitourinário em humanos. A surdez neurossensorial apresentada pelo paciente provavelmente advém da haploinsuficiência dos genes *HMX2* e *HMX3*, mas não é possível excluir a infecção de SNC neonatal como uma causa adicional.

## 6.5 Paciente 15

O paciente número 15 apresenta duas grandes CNVs na análise do *array* genômico. Uma duplicação na região cromossômica 14q11.2-q12 de 6,6MB e uma deleção na região 21p11.2-q21.3 de 12,7MB. As duas regiões são ricas em genes OMIM e foram categorizadas como patogênicas após avaliação e comparação com os bancos de dados. Essas CNVs são consideradas raras, não estando presentes em bancos de dados de indivíduos saudáveis, e contem grande quantidade de genes que são reconhecidamente associados a fenótipos clínicos quando mutados. Trata-se, portanto, de uma síndrome de genes contíguos, que justifica a apresentação clínica do paciente.

Na região 14q11.2-q12, CNVs do tipo deleção contendo os dois genes *CHD8* e *SUPT16H*, foram descritas em pacientes como causadoras de fenótipos neuropsiquiátricos como atraso motor e de linguagem, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), e espectro autista (PRONTERA; OTTAVIANI; TOCCACELI; ROGAIA *et al.*, 2014; TERRONE; CAPPUCCIO; GENESIO; ESPOSITO *et al.*, 2014; ZAHIR; FIRTH; BAROSS; DELANEY *et al.*, 2007). Recentemente, duplicações desses mesmo genes foram implicados em fenótipos de espectro autista, TDAH e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, com diversos casos descritos no DECIPHER com sobreposição dessa região nos indivíduos registrados nessa base de dados sob o número 289709 (0.48 Mb), 279247 (0.16 Mb), e 289620 (0.18 Mb) (SMYK; POLUHA; JASZCZUK; BARTNIK *et al.*, 2016).

Monfort *et al.* relatou em 2007 um paciente masculino, sem história de consanguinidade ou casos semelhantes na família que apresentava fenótipo muito semelhante ao do paciente 15 e cuja investigação revelou uma duplicação da mesma região do nosso paciente. Essa criança ao nascimento era pequeno para idade gestacional e com baixo peso e apresentava dimorfismos faciais e corporais. No seguimento clínico foi observado atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. Em relação aos dimorfismos corporais, o paciente descrito apresentava sindactilia do 2-3 pododáctilo e clinodactilia assim como nosso paciente. O paciente descrito também apresentava hipogenitalismo porém com gonadotrofinas e testosterona normal para idade aos 13 anos, diferente do nosso paciente (MONFORT; BLESÁ; ROSELLÓ; ORELLANA *et al.*, 2007).

Em outro paciente inserido no banco de dados do DECIPHER sob o número 415353, uma duplicação de 5,2Mb sobreposta à da região duplicada do paciente 15 foi considerada patogênica e responsável pelo fenótipo de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor associado a hipospádia e hipogonadismo. O paciente também possuía microcefalia e baixa estatura assim como nosso paciente.

A segunda CNV patogênica identificada no paciente 15 localiza-se na região 21p11.2-q21.3 e consiste em uma deleção de 12,7MB. Essa região é rica em genes OMIM e uma síndrome previamente descrita foi associada à deleção de múltiplos genes nessa região.

A síndrome de deleção 21q é uma síndrome de fenótipo bastante heterogêneo. Descrita pela primeira vez em 1964 por Lejeune et al. como o relato de um caso de monossomia parcial do cromossomo 21 (LEJEUNE; BERGER; RETHORE; ARCHAMBAULT *et al.*, 1964). Desde então, surgiram diversos relatos na literatura de pacientes portadores de microdeleções no braço curto do cromossomo 21. Lyle et al. e Roberson et al. descreveram duas series de casos totalizando 21 indivíduos com microdeleções em diversos pontos do cromossomo 21 correlacionando genótipo/fenótipo (LYLE; BÉNA; GAGOS; GEHRIG *et al.*, 2009; ROBERSON; WOHLER; HOOVER-FONG; LISI *et al.*, 2011). O fenótipo dos pacientes com deleção 21q pode ser bastante variável, desde comprometimento neurológico grave com retardo mental, malformação de SNC, cardiopatia congênita e malformação geniturinária até quadros mais leves com dismorfismos discretos e atraso mental leve (LINDSTRAND; MALMGREN; SAHLÉN; SCHOUMANS *et al.*, 2010; LYLE; BÉNA; GAGOS; GEHRIG *et al.*, 2009; ROBERSON; WOHLER; HOOVER-FONG; LISI *et al.*, 2011; TAKHAR; MALLA; SIU; MACPHERSON *et al.*, 2002; YAO; CHEN; FLORES-SARNAT; BARLOW *et al.*, 2006).

A região cromossômica 21q deletada parece guardar relação com a gravidade do fenótipo. Lyle et al. e Roberson et al demonstraram que deleções intersticiais a partir do centrômero do 21q habitualmente são grandes, podendo chegar a ter mais de 12Mb deletados, e podem estar associadas a outros rearranjos cromossômicos, levando a um fenótipo mais grave nos indivíduos portadores dessas deleções. Já as deleções 21q terminais habitualmente são menores e os pacientes apresentam um fenótipo mais brando (LYLE; BÉNA; GAGOS; GEHRIG *et al.*, 2009; ROBERSON; WOHLER; HOOVER-FONG; LISI *et al.*, 2011).

O paciente número 15, assim como os pacientes portadores de grandes

deleções intersticiais no 21q descritos na literatura apresentam fenótipos mais severos, com um atraso grave de desenvolvimento neuropsicomotor, atraso de linguagem e capacidade de interação social comprometida. Agenesia de corpo caloso associado a microcefalia são achados frequentes nos pacientes com deleção 21q. Atipia genital e/ou criptorquidía, como observado no paciente 15, foi relatado em pacientes com síndrome da deleção 21q, porém nenhum gene candidato relacionado a esse fenótipo foi proposto (HURET; LÉONARD; CHERY; PHILIPPE *et al.*, 1995).

## 6.6 Paciente 22

O *SNP-array* realizado no DNA do paciente número 22 identificou uma grande deleção de 10,9MB nas coordenadas citogenômicas 13q33.1-q34. Essa é uma região cromossômica rica em genes, contendo pelo menos 32 genes descritos na base de dados do OMIM.

A literatura relata um grande número de pacientes, que apresentam anomalias anorretais e geniturinárias associadas a atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, nos quais deleções no braço longo do cromossomo 13 são encontradas, caracterizando-os como portadores da síndrome de deleção do 13q (#613884) (QUÉLIN; BENDAVID; DUBOURG; DE LA ROCHEBROCHARD *et al.*, 2009; REINSTEIN; LIBERMAN; FEINGOLD-ZADOK; TENNE *et al.*, 2016; SAGIDAIN; GOLDBERG; PELEG; SUKENIK-HALEVY *et al.*, 2019; TRANEBJAERG; NIELSEN; TOMMERUP; WARBURG *et al.*, 1988).

Por outro lado, em bancos de dados de indivíduos saudáveis, alterações na região 13q com dimensões comparáveis a do paciente em estudo não são descritas. Baseado nestes critérios, essa alteração foi considerada patogênica e capaz de explicar o fenótipo apresentado pelo paciente e estabelecendo a presença de uma síndrome de deleção de genes contíguos.

A síndrome da deleção 13q foi proposta pela primeira vez na literatura por Allderdice *et al.* em 1969 (ALLDERDICE; DAVIS; MILLER; KLINGER *et al.*, 1969) após descrever dois pacientes com monossomia por deleção parcial do braço longo do cromossomo 13. Os dois pacientes descritos apresentavam comprometimento grave do desenvolvimento neuropsicomotor com dismorfismos faciais (microcefalia, hipertelorismo ocular, micrognatia, base nasal larga e um deles

com microftalmia). Um dos casos apresentava também anomalia anorretal (ânus imperfurado e fistula perineal) com genitália atípica caracterizada por hipospádia perineal, gônadas palpáveis e escroto bífido. Desde então, algumas series de casos de pacientes portadores de deleções 13q foram descritos, permitindo estabelecer alguns dos fenótipos associados a esta síndrome. A apresentação clínica guarda relação não apenas com o tamanho da deleção mas também com a região deletada, sendo dessa maneira subdividida em 3 grupos. A síndrome da deleção 13q do primeiro grupo apresenta deleção proximal 13q12.2-q31 e com fenótipo mais brando (dismorfismos leves, déficit cognitivo leve/moderado, predisposição ao retinoblastoma), a do grupo dois compreende a deleção 13q12.2-q32, e o terceiro grupo são deleção 13q33-q34 ambas com fenótipo mais complexo (dismorfismo importantes, déficit cognitivo moderado a grave, microcefalia e baixa estatura) (BROWN; GERSEN; ANYANE-YEBOA; WARBURTON, 1993; BROWN; RUSSO; CHITAYAT; WARBURTON, 1995; FRYNS, 1995; LUO; BALKIN; STEWART; SARWARK *et al.*, 2000).

O atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e dismorfismos faciais diversos são os achados mais prevalentes nesses indivíduos; malformação anorretal (atresia anal, redução da distância anogenital), genitourinárias (hipospádia, transposição penoescrotal, malformações renais incluindo ureterohidronefrose), de extremidades e cardiopatia congênita também podem estar presentes (BROWN; GERSEN; ANYANE-YEBOA; WARBURTON, 1993; BROWN; RUSSO; CHITAYAT; WARBURTON, 1995; GUTIERREZ; SEPULVEDA; SAEZ; CARSTENS *et al.*, 2001; KUHNLE; BARTSCH; WERNER; SCHUSTER, 2000; LUO; BALKIN; STEWART; SARWARK *et al.*, 2000; SAGI-DAIN; GOLDBERG; PELEG; SUKENIK-HALEVY *et al.*, 2019).

A monossomia da região 13q33.1-q34 identificada no paciente 22 determina a haploinsuficiência dos genes contidos nessa região, dentre eles o gene Efrinalin B2 (*EFNB2*). Em modelos animais utilizando camundongos *knockout* para o gene *Efnb2* ou para o seu receptor murino observa-se o desenvolvimento de animais que apresentam defeito de septação cloacal, com hipospádia grave em camundongos machos (DRAVIS; YOKOYAMA; CHUMLEY; COWAN *et al.*, 2004).

O gene *Efnb2* em camundongos tem seu homólogo em humanos *EFNB2* (OMIM 600527) localizado no cromossomo 13q33.3. Este gene codifica um membro da família ephrin (EPH). As efrinas e os receptores relacionados à EPH compreendem

a maior subfamília das proteínas-tirosina-quinases receptoras e têm sido implicados na mediação de diversos eventos de desenvolvimento, especialmente no sistema nervoso e na eritropoiese. Em humanos, o gene *EFNB2* codifica uma efrina da classe EFNB que se liga aos receptores EPHB4 e EPHA3, e desempenha atividade crucial nos processos de migração, repulsão e adesão, que ocorrem durante o desenvolvimento neuronal, vascular, epitelial e do sistema urinário (DRESCHER, 2002; KLEIN, 2012; PEUCKERT; ARESH; HOLENYA; ADAMS *et al.*, 2016; SALVUCCI; TOSATO, 2012; WEISS; KISPERT, 2016).

O paciente número 22 apresentava quadro malformativo anorretal (estenose anal) associado a malformação geniturinária (ectopia renal direita com refluxo vesicoureteral em rim esquerdo, hipospádia e criptorquidía), que poderiam ser associados à haploinsuficiência de genes contidos na região q33.1-q34. A haploinsuficiência do gene *EFNB2* (pLI = 0,99), constitui a principal condição candidata como o causadora das malformações anorretais e urogenitais, visto o fenótipo similar observado em camundongos em condição genética equivalente.

Além disso, pacientes com deleção do 13q como nosso paciente apresentam dificuldade escolar e atraso motor e de linguagem. Dentre os 32 genes listados na plataforma OMIM perdidos nessa deleção, *SOX1* e *ARHGEF7* foram recentemente associados a fenótipo de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e quadro convulsivo em dois irmãos (ORSINI; BONUCCELLI; STRIANO; AZZARA *et al.*, 2018). Apesar de nosso paciente não apresentar um fenótipo convulsivo, esses genes participam da morfogênese cerebral, guardando relação com o neurodesenvolvimento comprometido em nosso paciente. O fenótipo neuropsiquiátrico do paciente advém da perda de 86 genes, que geraram uma síndrome de genes contíguos, sendo improvável atribuir a apenas um desses genes a responsabilidade desse fenótipo.

É importante salientar, que o paciente também possui o diagnóstico de deficiência parcial dos fatores VII e X de coagulação. Enquanto o fator VII participa apenas da via extrínseca da coagulação, ativando o fator X de coagulação, o fator X participa tanto da via intrínseca quanto extrínseca da coagulação, tendo papel central no processo de formação do coágulo em humanos. (BROOKS; MECK; HADDAD; BENDAVID *et al.*, 2006; PFEIFFER; OTT; GILGENKRANTZ; ALEXANDRE, 1982; SCAMBLER; WILLIAMSON, 1985) (HEWSON; CARTER, 2002).

Os genes desses dois fatores VII e X da coagulação estão localizados no região 13q34 e a haploinsuficiência desses genes provocam discrasias hemorrágias em humanos OMIM #227500 e OMIM #227600, assim como o ganho de cópias desses mesmos genes predispõem a estados pró-coagulantes (GILGENKRANTZ; BRIQUEL; ANDRÉ; ALEXANDRE *et al.*, 1986; PFEIFFER; OTT; GILGENKRANTZ; ALEXANDRE, 1982).



## 7. CONCLUSÕES

- A técnica de *SNP-array* identificou CNVs patogênicas ou provavelmente patogênicas em seis pacientes (27,3%).
- A técnica de *SNP-array* permitiu estabelecer a causa molecular das diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual em dois pacientes (10%). Em outros três pacientes foram identificadas CNVs patogênicas que continham genes candidatos relacionados à DDS, e podem justificar o fenótipo de DDS apresentado (23%). Em apenas um dos pacientes com CNV provavelmente patogênica a CNV não foi associada à causa da DDS porém, contribuiu para esclarecer parcialmente o fenótipo sindrômico do paciente.
- A técnica de array contribuiu para reforçar a relação dos genes *FGFR2*, *EMX2* e *EFNB2* como cauda de DDS em humanos.
- A análise de *SNP-array* permitiu expandir a taxa de detecção de desequilíbrios genômicos não detectados anteriormente pela análise do cariótipo em pacientes com diferenças/distúrbios do desenvolvimento sexual associado a outras anomalias congênitas de etiologia desconhecida.
- A relevância das 65 variantes de significado incerto (VUS) identificadas para os fenótipos dos pacientes avaliados ainda é desconhecida, já que não há evidências suficientes no momento para concluir se as CNVs são patogênicas ou benignas. Um maior número de estudos em pacientes com DDS e fenótipos sindrômicos semelhantes é necessário para que se possa detectar a existência de CNVs recorrentes possivelmente relacionadas a novas síndromes.
- Devido a sua maior resolução e menor tempo de execução, as plataformas de *array* devem substituir a cariotipagem clássica como método de escolha para avaliação de pacientes sindrômicos em nosso país, em conformidade com o que já é recomendado em outros países.

**ANEXOS**

## ANEXO I – TCLE

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1 NOME: .....

NOME DO PAI: .....

NOME DA MÃE: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE No : ..... SEXO : .M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO.....No.....APTO:.....

BAIRRO.....CIDADE.....

CEP:.....TELEFONE (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor,curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: .....No ..... APTO: .....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE:(.....).....

##### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

#### **Estudo dos genes relacionados ao distúrbio do desenvolvimento sexual**

PESQUISADOR : Berenie Bilharinho de Mendonça

CARGO/FUNÇÃO: Professora titular

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL No 20305

UNIDADE DO HCFMUSP: Endocrinologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável\_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador\_\_\_\_\_

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas no endereço: LIM 42 do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, localizado na rua Eneas de Carvalho Aguiar, 255 São Paulo/SP. Telefone(s) 11 26617512. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5o andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br).

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo” Eu discuti com o Dr. Berenice B Mendonça sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal      Data   /   /

-----

Assinatura da testemunha                                  Data   /   /

-----

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----

Assinatura do responsável pelo estudo                  Data   /   /

## ANEXO II – Protocolo De Avaliação Clínico-Laboratorial

Avaliação Clínica e Laboratorial DDS + alterações sindrômicas

Data:

Nome: \_\_\_\_\_

RGHC: \_\_\_\_\_ Data Nascimento: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Procedência: \_\_\_\_\_

Raça: \_\_\_\_\_

Ancestralidade Pai: \_\_\_\_\_ Ancestralidade Mãe: \_\_\_\_\_

DNA: Sim ( ) Número:

Sexo Criação: M( ) F( ) Mudança Registro: SIM( ) NÃO( )

HPMA:

---

---

---

---

---

Intercorrências Gestacionais: G P A

-Doenças na gestação: \_\_\_\_\_

-Medicação na gestação: \_\_\_\_\_

-USG gestação: \_\_\_\_\_

Intercorrências no Parto:

-Idade Gestacional

-Tipo parto/apresentação:

Intercorrências Neonatais:

-PN CN PC Apgar

- Sofrimento Fetal:

DNPM

- Sustento cervical

- Sentou

- Andou

- Falou

- Controle esfíncter

- Escola

Idade Desenvolvimento Puberal

-Telarca/gonadarca: Pubarca: Menarca:

-Aumento musculatura: Mudança da voz:

-Pilificação:

-Acne:

Atividade Sexual/Relacionamentos:

---

HF Consanguinidade: Sim ( ) Não ( )

-Pai: idade Est. PC DNA:

-Mãe: idade Est. PC Menarca: DNA:

-TH:

-Irmãos: Sim ( ) Não ( ) Número ( ) Idades:

-Fertilidade:

-Doenças na Família:

- Casos semelhantes na família:

Genitália ao Nascimento:

Gônadas: -palpáveis Sim ( ) Não ( ) -tópicas Sim ( ) Não ( )

Falus:

-Tamanho:

-Posição uretra:

Exame Físico Atual:

Estatuta Final:

Idade:      Peso:      (Z    )      Estatura:      (Z    )

Env:      PC:      PA:      mmHg

Geral:

---



---



---

Dismorfismo facial:

Não ( ) Sim ( ) Descreva:

Olhos: \_\_\_\_\_

Nariz: \_\_\_\_\_

Boca: \_\_\_\_\_

Orelhas: \_\_\_\_\_

Pescoço: \_\_\_\_\_

Microcefalia ( ) Macrocefalia( ) Baixa estatura ( ) Alta Estatura( )

## Anomalias Congênitas:

Descreva:

SNC: \_\_\_\_\_

Cardíaca: \_\_\_\_\_

Abdome: \_\_\_\_\_

Renal: \_\_\_\_\_

Genitália: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Esquelética: \_\_\_\_\_

Pele: \_\_\_\_\_

Tratamento:

-Cirurgia: Sim ( ) Não ( )

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

-Anatomia Patológica (gônadas):

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

-Medicamentoso:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Exames Laboratoriais:

-Testes:

1- hCG:

2- GnRH:

- Basais

LH	Progesterona	DHEA
FSH	TSH	DHEAS
Prolactina	T4T	Androstenediona
Inibina	T4L	HB/HT
Testo T	T3	Na/K
Testo L	ACTH	Glicemia
SHBG	Cortisol	

Estradiol                      17OHP

Exames de imagem: -

---

---

---

---

---

DIAGNÓSTICO:

-Cariótipo:

-Investigação Genética:

Heredograma



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHERMANN, J. C.; DOMENICE, S.; BACHEGA, T. A.; NISHI, M. Y. *et al.* Disorders of sex development: effect of molecular diagnostics. **Nat Rev Endocrinol**, 11, n. 8, p. 478-488, Aug 2015.

AHMED, S. F.; BASHAMBOO, A.; LUCAS-HERALD, A.; MCELREAVEY, K. Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD. **Br Med Bull**, 106, p. 67-89, 2013.

AICARDI, J.; CHEVRIE, J. J.; ROUSSELIE, F. [Spasma-in-flexion syndrome, callosal agenesis, chorioretinal abnormalities]. **Arch Fr Pediatr**, 26, n. 10, p. 1103-1120, 1969.

AICARDI J, L. J.; A, L.-K.

AKULA, M.; PARK, J. W.; WEST-MAYS, J. A. Relationship between neural crest cell specification and rare ocular diseases. **J Neurosci Res**, Apr 16 2018.

ALLDERDICE, P. W.; DAVIS, J. G.; MILLER, O. J.; KLINGER, H. P. *et al.* The 13q-deletion syndrome. **Am J Hum Genet**, 21, n. 5, p. 499-512, Sep 1969.

AMARILLO, I. E.; NIEVERA, I.; HAGAN, A.; HUCHTHAGOWDER, V. *et al.* Integrated small copy number variations and epigenome maps of disorders of sex development. **Hum Genome Var**, 3, p. 16012, 2016.

ARBOLEDA, V. A.; LEE, H.; SANCHEZ, F. J.; DELOT, E. C. *et al.* Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development. **Clin Genet**, 83, n. 1, p. 35-43, Jan 2013.

BAETENS, D.; MLADENOV, W.; DELLE CHIAIE, B.; MENTEN, B. *et al.* Extensive clinical, hormonal and genetic screening in a large consecutive series of 46,XY neonates and infants with atypical sexual development. **Orphanet J Rare Dis**, 9, p. 209, 2014.

BAGHERI-FAM, S.; ONO, M.; LI, L.; ZHAO, L. *et al.* FGFR2 mutation in 46,XY sex reversal with craniosynostosis. **Hum Mol Genet**, 24, n. 23, p. 6699-6710, Dec 1 2015.

BALLABIO, A.; ANDRIA, G. Deletions and translocations involving the distal short arm of the human X chromosome: review and hypotheses. **Hum Mol Genet**, 1, n. 4, p. 221-227, Jul 1992.

BAXTER, R. M.; ARBOLEDA, V. A.; LEE, H.; BARSEGHYAN, H. *et al.* Exome sequencing for the diagnosis of 46,XY disorders of sex development. **J Clin Endocrinol Metab**, 100, n. 2, p. E333-344, Feb 2015.

BEJJANI, B. A.; SHAFFER, L. G. Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. **J Mol Diagn**, 8, n. 5, p. 528-533, Nov 2006.

BELEZA-MEIRELES, A.; LUNDBERG, F.; LAGERSTEDT, K.; ZHOU, X. *et al.* FGFR2, FGF8, FGF10 and BMP7 as candidate genes for hypospadias. **Eur J Hum Genet**, 15, n. 4, p. 405-410, Apr 2007.

BIDINOST, C.; MATSUMOTO, M.; CHUNG, D.; SALEM, N. *et al.* Heterozygous and homozygous mutations in PITX3 in a large Lebanese family with posterior polar cataracts and neurodevelopmental abnormalities. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 47, n. 4, p. 1274-1280, Apr 2006.

BROOKS, B. P.; MECK, J. M.; HADDAD, B. R.; BENDAVID, C. *et al.* Factor VII deficiency and developmental abnormalities in a patient with partial monosomy of 13q and trisomy of 16p: case report and review of the literature. **BMC Med Genet**, 7, p. 2, Jan 13 2006.

BROWN, S.; GERSEN, S.; ANYANE-YEBOA, K.; WARBURTON, D. Preliminary definition of a "critical region" of chromosome 13 in q32: report of 14 cases with 13q deletions and review of the literature. **Am J Med Genet**, 45, n. 1, p. 52-59, Jan 1 1993.

BROWN, S.; RUSSO, J.; CHITAYAT, D.; WARBURTON, D. The 13q- syndrome: the molecular definition of a critical deletion region in band 13q32. **Am J Hum Genet**, 57, n. 4, p. 859-866, Oct 1995.

BURDON, K. P.; MCKAY, J. D.; WIRTH, M. G.; RUSSELL-EGGIT, I. M. *et al.* The PITX3 gene in posterior polar congenital cataract in Australia. **Mol Vis**, 12, p. 367-371, Apr 18 2006.

CHAN, A. O.; BUT, W. M.; LEE, C. Y.; LAM, Y. Y. *et al.* Aetiological bases of 46,XY disorders of sex development in the Hong Kong Chinese population. **Hong Kong Med J**, 21, n. 6, p. 499-510, Dec 2015.

CHEN, C. P.; CHERN, S. R.; WANG, T. H.; HSUEH, D. W. *et al.* Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic analysis of partial monosomy 10q (10q25.3-->qter) and partial trisomy 18q (18q23-->qter) in a fetus associated with cystic hygroma and ambiguous genitalia. **Prenat Diagn**, 25, n. 6, p. 492-496, Jun 2005.

CHEN, J.; KANG, X. Y.; TANG, C. X.; GAO, D. S. Impact of Pitx3 gene knockdown on glial cell line-derived neurotrophic factor transcriptional activity in dopaminergic neurons. **Neural Regen Res**, 12, n. 8, p. 1347-1351, Aug 2017.

CHEN, L.; DING, X. P.; WEI, X.; LI, L. X. Investigation of mutations in the SRY, SOX9, and DAX1 genes in sex reversal patients from the Sichuan region of China. **Genet Mol Res**, 13, n. 1, p. 1518-1526, Mar 12 2014.

CHIANG, H. S.; WU, Y. N.; WU, C. C.; HWANG, J. L. Cytogenic and molecular analyses of 46,XX male syndrome with clinical comparison to other groups with testicular azoospermia of genetic origin. **J Formos Med Assoc**, 112, n. 2, p. 72-78, Feb 2013.

CHUNG, Y. P.; HWA, H. L.; TSENG, L. H.; SHYU, M. K. *et al.* Prenatal diagnosis of monosomy 10q25 associated with single umbilical artery and sex reversal: report of a case. **Prenat Diagn**, 18, n. 1, p. 73-77, Jan 1998.

COLVIN, J. S.; GREEN, R. P.; SCHMAHL, J.; CAPEL, B. *et al.* Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. **Cell**, 104, n. 6, p. 875-889, Mar 23 2001.

DIGILIO, M. C.; BERNARDINI, L.; MINGARELLI, R.; CAPOLINO, R. *et al.* 3q29 Microdeletion: a mental retardation disorder unassociated with a recognizable phenotype in two mother-daughter pairs. **Am J Med Genet A**, 149a, n. 8, p. 1777-1781, Aug 2009.

DONNENFELD, A. E.; PACKER, R. J.; ZACKAI, E. H.; CHEE, C. M. *et al.* Clinical, cytogenetic, and pedigree findings in 18 cases of Aicardi syndrome. **Am J Med Genet**, 32, n. 4, p. 461-467, Apr 1989.

DRAVIS, C.; YOKOYAMA, N.; CHUMLEY, M. J.; COWAN, C. A. *et al.* Bidirectional signaling mediated by ephrin-B2 and EphB2 controls urorectal development. **Dev Biol**, 271, n. 2, p. 272-290, Jul 15 2004.

DRESCHER, U. Eph family functions from an evolutionary perspective. **Curr Opin Genet Dev**, 12, n. 4, p. 397-402, Aug 2002.

EBLE, T. N.; SUTTON, V. R.; SANGI-HAGHPEYKAR, H.; WANG, X. *et al.* Non-random X chromosome inactivation in Aicardi syndrome. **Hum Genet**, 125, n. 2, p. 211-216, Mar 2009.

FECHNER, P. Y.; ROSENBERG, C.; STETTEN, G.; CARGILE, C. B. *et al.* Nonrandom inactivation of the Y-bearing X chromosome in a 46,XX individual: evidence for the etiology of 46,XX true hermaphroditism. **Cytogenet Cell Genet**, 66, n. 1, p. 22-26, 1994.

FRYNS, J. P. Microcephaly/lymphedema and terminal deletion of the long arm of chromosome 13. **Am J Med Genet**, 57, n. 3, p. 504, Jul 3 1995.

GARTLER, S. M. The chromosome number in humans: a brief history. **Nat Rev Genet**, 7, n. 8, p. 655-660, Aug 2006.

GILGENKRANTZ, S.; BRIQUEL, M. E.; ANDRÉ, E.; ALEXANDRE, P. *et al.* Structural genes of coagulation factors VII and X located on 13q34. **Ann Genet**, 29, n. 1, p. 32-35, 1986.

GOMES, N. L.; LERÁRIO, A. M.; MACHADO, A. Z.; MORAES, D. R. *et al.* Long-term outcomes and molecular analysis of a large cohort of patients with 46,XY disorder of sex development due to partial gonadal dysgenesis. **Clin Endocrinol (Oxf)**, 89, n. 2, p. 164-177, Aug 2018.

GOVIL-DALELA, T.; KUMAR, A.; AGARWAL, R.; CHUGANI, H. T. Agenesis of the Corpus Callosum and Aicardi Syndrome: A Neuroimaging and Clinical Comparison. **Pediatr Neurol**, 68, p. 44-48.e42, Mar 2017.

GRAW, J. Congenital hereditary cataracts. **Int J Dev Biol**, 48, n. 8-9, p. 1031-1044, 2004.

GRINSPON, R. P.; REY, R. A. Disorders of Sex Development with Testicular Differentiation in SRY-Negative 46,XX Individuals: Clinical and Genetic Aspects. **Sex Dev**, 10, n. 1, p. 1-11, 2016.

GRINSPON, R. P.; REY, R. A. Molecular Characterization of XX Maleness. **Int J Mol Sci**, 20, n. 23, Dec 3 2019.

GUELLAEN, G.; CASANOVA, M.; BISHOP, C.; GELDWERTH, D. *et al.* Human XX males with Y single-copy DNA fragments. **Nature**, 307, n. 5947, p. 172-173, Jan 12-18 1984.

GUTIERREZ, J.; SEPULVEDA, W.; SAEZ, R.; CARSTENS, E. *et al.* Prenatal diagnosis of 13q- syndrome in a fetus with holoprosencephaly and thumb agenesis. **Ultrasound Obstet Gynecol**, 17, n. 2, p. 166-168, Feb 2001.

HAINES, B.; HUGHES, J.; CORBETT, M.; SHAW, M. *et al.* Interchromosomal insertional translocation at Xq26.3 alters SOX3 expression in an individual with XX male sex reversal. **J Clin Endocrinol Metab**, 100, n. 5, p. E815-820, May 2015.

HARRISON, S. M.; GRANBERG, C. F.; KEAYS, M.; HILL, M. *et al.* DNA copy number variations in patients with 46,XY disorders of sex development. **J Urol**, 192, n. 6, p. 1801-1806, Dec 2014.

HEWSON, M. P.; CARTER, J. M. Severe congenital Factor VII deficiency associated with the 13q deletion syndrome. **Am J Hematol**, 71, n. 3, p. 232-233, Nov 2002.

HOLLENBECK, D.; WILLIAMS, C. L.; DRAZBA, K.; DESCARTES, M. *et al.* Clinical relevance of small copy-number variants in chromosomal microarray clinical testing. **Genet Med**, 19, n. 4, p. 377-385, Apr 2017.

HOUK, C. P.; HUGHES, I. A.; AHMED, S. F.; LEE, P. A. Summary of consensus statement on intersex disorders and their management. International Intersex Consensus Conference. **Pediatrics**, 118, n. 2, p. 753-757, Aug 2006.

HUGHES, I. A. Disorders of sex development: a new definition and classification. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 22, n. 1, p. 119-134, Feb 2008.

HUGHES, I. A.; HOUK, C.; AHMED, S. F.; LEE, P. A. Consensus statement on management of intersex disorders. **Arch Dis Child**, 91, n. 7, p. 554-563, Jul 2006.

HURET, J. L.; LÉONARD, C.; CHERY, M.; PHILIPPE, C. *et al.* Monosomy 21q: two cases of del(21q) and review of the literature. **Clin Genet**, 48, n. 3, p. 140-147, Sep 1995.

HUTSON, J. M.; GROVER, S. R.; O'CONNELL, M.; PENNELL, S. D. Malformation syndromes associated with disorders of sex development. **Nat Rev Endocrinol**, 10, n. 8, p. 476-487, Aug 2014.

IGARASHI, M.; DUNG, V. C.; SUZUKI, E.; IDA, S. *et al.* Cryptic genomic rearrangements in three patients with 46,XY disorders of sex development. **PLoS One**, 8, n. 7, p. e68194, 2013.

IRVING, M.; HANSON, H.; TURNPENNY, P.; BREWER, C. *et al.* Deletion of the distal long arm of chromosome 10; is there a characteristic phenotype? A report of 15 de novo and familial cases. **Am J Med Genet A**, 123a, n. 2, p. 153-163, Dec 1 2003.

JARRAH, N.; EL-SHANTI, H.; KHIER, A.; OBEIDAT, F. N. *et al.* Familial disorder of sex determination in seven individuals from three related sibships. **Eur J Pediatr**, 159, n. 12, p. 912-918, Dec 2000.

KAN, S. H.; ELANKO, N.; JOHNSON, D.; CORNEJO-ROLDAN, L. *et al.* Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. **Am J Hum Genet**, 70, n. 2, p. 472-486, Feb 2002.

KEARNEY, H. M.; THORLAND, E. C.; BROWN, K. K.; QUINTERO-RIVERA, F. *et al.* American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. **Genet Med**, 13, n. 7, p. 680-685, Jul 2011.

KIM, Y.; BINGHAM, N.; SEKIDO, R.; PARKER, K. L. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 42, p. 16558-16563, Oct 16 2007.

KLEIN, R. Eph/ephrin signalling during development. **Development**, 139, n. 22, p. 4105-4109, Nov 2012.

KON, M.; FUKAMI, M. Submicroscopic copy-number variations associated with 46,XY disorders of sex development. **Mol Cell Pediatr**, 2, n. 1, p. 7, Dec 2015.

KRONER, B. L.; PREISS, L. R.; ARDINI, M. A.; GAILLARD, W. D. New incidence, prevalence, and survival of Aicardi syndrome from 408 cases. **J Child Neurol**, 23, n. 5, p. 531-535, May 2008.

KUHNLE, U.; BARTSCH, O.; WERNER, W.; SCHUSTER, T. Penoscrotal inversion, hypospadias, imperforate anus, facial anomalies, and developmental delay: definition of a new clinical syndrome. **Pediatr Surg Int**, 16, n. 5-6, p. 396-399, 2000.

KULIKOWSKI, L. D. **Citogenômica Aplicada à Prática Médica**. São Paulo: Editora Atheneu, 112 p. (Série de pesquisa à prática clínica).

KUSAKA, M.; KATOH-FUKUI, Y.; OGAWA, H.; MIYABAYASHI, K. *et al.* Abnormal epithelial cell polarity and ectopic epidermal growth factor receptor

(EGFR) expression induced in Emx2 KO embryonic gonads. **Endocrinology**, 151, n. 12, p. 5893-5904, Dec 2010.

KUSZ, K.; KOTECKI, M.; WOJDA, A.; SZARRAS-CZAPNIK, M. *et al.* Incomplete masculinisation of XX subjects carrying the SRY gene on an inactive X chromosome. **J Med Genet**, 36, n. 6, p. 452-456, Jun 1999.

LEDIG, S.; HIORT, O.; SCHERER, G.; HOFFMANN, M. *et al.* Array-CGH analysis in patients with syndromic and non-syndromic XY gonadal dysgenesis: evaluation of array CGH as diagnostic tool and search for new candidate loci. **Hum Reprod**, 25, n. 10, p. 2637-2646, Oct 2010.

LEDIG, S.; SCHIPPERT, C.; STRICK, R.; BECKMANN, M. W. *et al.* Recurrent aberrations identified by array-CGH in patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. **Fertil Steril**, 95, n. 5, p. 1589-1594, Apr 2011.

LEJEUNE, J.; BERGER, R.; RETHORE, M. O.; ARCHAMBAULT, L. *et al.* [PARTIAL MONOSOMY FOR A SMALL ACROCENTRIC CHROMOSOME]. **C R Hebd Seances Acad Sci**, 259, p. 4187-4190, Nov 30 1964.

LEWANDOWSKI, R. C., JR.; KUKOLICH, M. K.; SEARS, J. W.; MANKINEN, C. B. Partial deletion 10q. **Hum Genet**, 42, n. 3, p. 339-343, Jun 27 1978.

LINDSTRAND, A.; MALMGREN, H.; SAHLÉN, S.; SCHOUMANS, J. *et al.* Detailed molecular and clinical characterization of three patients with 21q deletions. **Clin Genet**, 77, n. 2, p. 145-154, Feb 2010.

LUO, J.; BALKIN, N.; STEWART, J. F.; SARWARK, J. F. *et al.* Neural tube defects and the 13q deletion syndrome: evidence for a critical region in 13q33-34. **Am J Med Genet**, 91, n. 3, p. 227-230, Mar 20 2000.

LYLE, R.; BÉNA, F.; GAGOS, S.; GEHRIG, C. *et al.* Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. **Eur J Hum Genet**, 17, n. 4, p. 454-466, Apr 2009.

LÉVY, J.; HAYE, D.; MARZILIANO, N.; CASU, G. *et al.* EFNB2 haploinsufficiency causes a syndromic neurodevelopmental disorder. **Clin Genet**, 93, n. 6, p. 1141-1147, 06 2018.

MAJZOUB, A.; ARAFA, M.; STARKS, C.; ELBARDISI, H. *et al.* 46 XX karyotype during male fertility evaluation; case series and literature review. **Asian J Androl**, 19, n. 2, p. 168-172, Mar-Apr 2017.

MCGOWAN, R.; TYDEMAN, G.; SHAPIRO, D.; CRAIG, T. *et al.* DNA copy number variations are important in the complex genetic architecture of mullerian disorders. **Fertil Steril**, 103, n. 4, p. 1021-1030.e1021, Apr 2015.

MENDONCA, B. B.; DOMENICE, S.; ARNHOLD, I. J.; COSTA, E. M. 46,XY disorders of sex development (DSD). **Clin Endocrinol (Oxf)**, 70, n. 2, p. 173-187, Feb 2009.

MENGEN, E.; KAYHAN, G.; KOCAAY, P.; UÇAKTÜRK, S. A. A Duplication Upstream of SOX9 Associated with SRY Negative 46,XX Ovotesticular Disorder of Sex Development: A Case Report. **J Clin Res Pediatr Endocrinol**, 12, n. 3, p. 308-314, Sep 2 2020.

MILLER, N. D.; NANCE, M. A.; WOHLER, E. S.; HOOVER-FONG, J. E. *et al.* Molecular (SNP) analyses of overlapping hemizygous deletions of 10q25.3 to 10qter in four patients: evidence for HMX2 and HMX3 as candidate genes in hearing and vestibular function. **Am J Med Genet A**, 149a, n. 4, p. 669-680, Feb 15 2009.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, 16, n. 3, p. 1215, Feb 11 1988.

MIYAMOTO, N.; YOSHIDA, M.; KURATANI, S.; MATSUO, I. *et al.* Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. **Development**, 124, n. 9, p. 1653-1664, May 1997.

MOHAMMADPOUR LASHKARI, F.; TOTONCHI, M.; ZAMANIAN, M. R.; MANSOURI, Z. *et al.* 46,XX males: a case series based on clinical and genetics evaluation. **Andrologia**, 49, n. 7, Sep 2017.

MONFORT, S.; BLESÁ, D.; ROSELLÓ, M.; ORELLANA, C. *et al.* Duplication of 14q11.2 associates with short stature and mild mental retardation: a putative relation with quantitative trait loci. **Am J Med Genet A**, 143, n. 4, p. 382-384, Feb 15 2007.

MOREL, Y.; ROUCHER, F.; MALLET, D.; PLOTTON, I. Genetic of gonadal determination. **Ann Endocrinol (Paris)**, 75, n. 2, p. 32-39, May 2014.

MUNGER, S. C.; CAPEL, B. Sex and the circuitry: progress toward a systems-level understanding of vertebrate sex determination. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, 4, n. 4, p. 401-412, Jul-Aug 2012.

MURPHY, M. M.; LINDSEY BURRELL, T.; CUBELLS, J. F.; ESPANA, R. A. *et al.* Study protocol for The Emory 3q29 Project: evaluation of neurodevelopmental, psychiatric, and medical symptoms in 3q29 deletion syndrome. **BMC Psychiatry**, 18, n. 1, p. 183, Jun 8 2018.

NEIDICH, J. A.; NUSSBAUM, R. L.; PACKER, R. J.; EMANUEL, B. S. *et al.* Heterogeneity of clinical severity and molecular lesions in Aicardi syndrome. **J Pediatr**, 116, n. 6, p. 911-917, Jun 1990.

NORLING, A.; LINDEN HIRSCHBERG, A.; IWARSSON, E.; PERSSON, B. *et al.* Novel candidate genes for 46,XY gonadal dysgenesis identified by a customized 1 M array-CGH platform. **Eur J Med Genet**, 56, n. 12, p. 661-668, Dec 2013.

NOWAKOWSKA, B. Clinical interpretation of copy number variants in the human genome. **J Appl Genet**, 58, n. 4, p. 449-457, Nov 2017.

OGATA, T.; MUROYA, K.; SASAGAWA, I.; KOSHO, T. *et al.* Genetic evidence for a novel gene(s) involved in urogenital development on 10q26. **Kidney Int**, 58, n. 6, p. 2281-2290, Dec 2000.

ONESIMO, R.; ORTESCHI, D.; SCALZONE, M.; ROSSODIVITA, A. *et al.* Chromosome 9p deletion syndrome and sex reversal: novel findings and redefinition of the critically deleted regions. **Am J Med Genet A**, 158a, n. 9, p. 2266-2271, Sep 2012.

ONO, M.; HARLEY, V. R. Disorders of sex development: new genes, new concepts. **Nat Rev Endocrinol**, 9, n. 2, p. 79-91, Feb 2013.

ORSINI, A.; BONUCCELLI, A.; STRIANO, P.; AZZARA, A. *et al.* Generalized epilepsy and mild intellectual disability associated with 13q34 deletion: A potential role for SOX1 and ARHGEF7. **Seizure**, 59, p. 38-40, Jul 2018.

OSTRER, H. Disorders of sex development (DSDs): an update. **J Clin Endocrinol Metab**, 99, n. 5, p. 1503-1509, May 2014.

PEUCKERT, C.; ARESH, B.; HOLENYA, P.; ADAMS, D. *et al.* Multimodal Eph/Ephrin signaling controls several phases of urogenital development. **Kidney Int**, 90, n. 2, p. 373-388, Aug 2016.

PFEIFFER, R. A.; OTT, R.; GILGENKRANTZ, S.; ALEXANDRE, P. Deficiency of coagulation factors VII and X associated with deletion of a chromosome 13 (q34). Evidence from two cases with 46,XY,t(13;Y)(q11;q34). **Hum Genet**, 62, n. 4, p. 358-360, 1982.

PIARD, J.; MIGNOT, B.; ARBEZ-GINDRE, F.; AUBERT, D. *et al.* Severe sex differentiation disorder in a boy with a 3.8 Mb 10q25.3-q26.12 microdeletion encompassing EMX2. **Am J Med Genet A**, 164a, n. 10, p. 2618-2622, Oct 2014.

PRONTERA, P.; OTTAVIANI, V.; TOCCACELI, D.; ROGAIA, D. *et al.* Recurrent ~100 Kb microdeletion in the chromosomal region 14q11.2, involving CHD8 gene, is associated with autism and macrocephaly. **Am J Med Genet A**, 164a, n. 12, p. 3137-3141, Dec 2014.

QUINONEZ, S. C.; PARK, J. M.; RABAH, R.; OWENS, K. M. *et al.* 9p partial monosomy and disorders of sex development: review and postulation of a pathogenetic mechanism. **Am J Med Genet A**, 161a, n. 8, p. 1882-1896, Aug 2013.

QUINTERO-RIVERA, F.; SHARIFI-HANNAUER, P.; MARTINEZ-AGOSTO, J. A. Autistic and psychiatric findings associated with the 3q29 microdeletion syndrome: case report and review. **Am J Med Genet A**, 152a, n. 10, p. 2459-2467, Oct 2010.



QUÉLIN, C.; BENDAVID, C.; DUBOURG, C.; DE LA ROCHEBROCHARD, C. *et al.* Twelve new patients with 13q deletion syndrome: genotype-phenotype analyses in progress. **Eur J Med Genet**, 52, n. 1, p. 41-46, Jan-Feb 2009.

REARDON, W.; WINTER, R. M.; RUTLAND, P.; PULLEYN, L. J. *et al.* Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. **Nat Genet**, 8, n. 1, p. 98-103, Sep 1994.

REINSTEIN, E.; LIBERMAN, M.; FEINGOLD-ZADOK, M.; TENNE, T. *et al.* Terminal microdeletions of 13q34 chromosome region in patients with intellectual disability: Delineation of an emerging new microdeletion syndrome. **Mol Genet Metab**, 118, n. 1, p. 60-63, May 2016.

RICHARD, N.; LEPRINCE, C.; GRUCHY, N.; PIGNY, P. *et al.* Identification by array-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) of a large deletion of luteinizing hormone receptor gene combined with a missense mutation in a patient diagnosed with a 46,XY disorder of sex development and application to prenatal diagnosis. **Endocr J**, 58, n. 9, p. 769-776, 2011.

RIGGS, E. R.; ANDERSEN, E. F.; CHERRY, A. M.; KANTARCI, S. *et al.* Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). **Genet Med**, 22, n. 2, p. 245-257, 02 2020.

ROBERSON, E. D.; WOHLER, E. S.; HOOVER-FONG, J. E.; LISI, E. *et al.* Genomic analysis of partial 21q monosomies with variable phenotypes. **Eur J Hum Genet**, 19, n. 2, p. 235-238, Feb 2011.

ROPERS, H. H.; ZUFFARDI, O.; BIANCHI, E.; TIEPOLO, L. Agenesis of corpus callosum, ocular, and skeletal anomalies (X-linked dominant Aicardi's syndrome) in a girl with balanced X/3 translocation. **Hum Genet**, 61, n. 4, p. 364-368, 1982.

SAGI-DAIN, L.; GOLDBERG, Y.; PELEG, A.; SUKENIK-HALEVY, R. *et al.* The rare 13q33-q34 microdeletions: eight new patients and review of the literature. **Hum Genet**, 138, n. 10, p. 1145-1153, Oct 2019.

SALVUCCI, O.; TOSATO, G. Essential roles of EphB receptors and EphrinB ligands in endothelial cell function and angiogenesis. **Adv Cancer Res**, 114, p. 21-57, 2012.

SANGU, N.; OKAMOTO, N.; SHIMOJIMA, K.; ONDO, Y. *et al.* A de novo microdeletion in a patient with inner ear abnormalities suggests that the 10q26.13 region contains the responsible gene. **Hum Genome Var**, 3, p. 16008, 2016.

SCAMBLER, P. J.; WILLIAMSON, R. The structural gene for human coagulation factor X is located on chromosome 13q34. **Cytogenet Cell Genet**, 39, n. 3, p. 231-233, 1985.

SCHEMPP, W.; MÜLLER, G.; SCHERER, G.; BOHLANDER, S. K. *et al.* Localization of Y chromosome sequences and X chromosomal replication studies in XX males. **Hum Genet**, 81, n. 2, p. 144-148, Jan 1989.

SHAMS, I.; ROHMANN, E.; ESWARAKUMAR, V. P.; LEW, E. D. *et al.* Lacrimo-auriculo-dento-digital syndrome is caused by reduced activity of the fibroblast growth factor 10 (FGF10)-FGF receptor 2 signaling pathway. **Mol Cell Biol**, 27, n. 19, p. 6903-6912, Oct 2007.

SHAPIRO, S. D.; HANSEN, K. L.; PASZTOR, L. M.; DILIBERTI, J. H. *et al.* Deletions of the long arm of chromosome 10. **Am J Med Genet**, 20, n. 1, p. 181-196, Jan 1985.

SINCLAIR, A. H.; BERTA, P.; PALMER, M. S.; HAWKINS, J. R. *et al.* A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature**, 346, n. 6281, p. 240-244, Jul 19 1990.

SMYK, M.; POLUHA, A.; JASZCZUK, I.; BARTNIK, M. *et al.* Novel 14q11.2 microduplication including the CHD8 and SUPT16H genes associated with developmental delay. **Am J Med Genet A**, 170a, n. 5, p. 1325-1329, May 2016.

TAKHAR, J.; MALLA, A. K.; SIU, V.; MACPHERSON, C. *et al.* An interstitial deletion of the long arm of chromosome 21 in a case of a first episode of psychosis. **Acta Psychiatr Scand**, 106, n. 1, p. 71-74; discussion 74-75, Jul 2002.

TANABE, S.; AKIBA, T.; KATOH, M.; SATOH, T. Terminal deletion of chromosome 10q: clinical features and literature review. **Pediatr Int**, 41, n. 5, p. 565-567, Oct 1999.

TANNOUR-LOUET, M.; HAN, S.; CORBETT, S. T.; LOUET, J. F. *et al.* Identification of de novo copy number variants associated with human disorders of sexual development. **PLoS One**, 5, n. 10, p. e15392, Oct 26 2010.

TERRONE, G.; CAPPUCCIO, G.; GENESIO, R.; ESPOSITO, A. *et al.* A case of 14q11.2 microdeletion with autistic features, severe obesity and facial dysmorphisms suggestive of Wolf-Hirschhorn syndrome. **Am J Med Genet A**, 164a, n. 1, p. 190-193, Jan 2014.

TOSUR, M.; GEARY, C. A.; MATALON, R.; RADHAKRISHNAN, R. S. *et al.* Persistence of müllerian duct structures in a genetic male with distal monosomy 10q. **Am J Med Genet A**, 167a, n. 4, p. 791-796, Apr 2015.

TRANEBJAERG, L.; NIELSEN, K. B.; TOMMERUP, N.; WARBURG, M. *et al.* Interstitial deletion 13q: further delineation of the syndrome by clinical and high-resolution chromosome analysis of five patients. **Am J Med Genet**, 29, n. 4, p. 739-753, Apr 1988.

VAN DEN VEYVER, I. B.; ZOGHBI, H. Y. Genetic basis of Rett syndrome. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev**, 8, n. 2, p. 82-86, 2002.

VORONA, E.; ZITZMANN, M.; GROMOLL, J.; SCHURING, A. N. *et al.* Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46,XX male syndrome, compared with 47,XXY Klinefelter patients. **J Clin Endocrinol Metab**, 92, n. 9, p. 3458-3465, Sep 2007.

WANG, T.; LIU, J. H.; YANG, J.; CHEN, J. *et al.* 46, XX male sex reversal syndrome: a case report and review of the genetic basis. **Andrologia**, 41, n. 1, p. 59-62, Feb 2009.

WANG, W.; GRIMMER, J. F.; VAN DE WATER, T. R.; LUFKIN, T. Hmx2 and Hmx3 homeobox genes direct development of the murine inner ear and hypothalamus and can be functionally replaced by Drosophila Hmx. **Dev Cell**, 7, n. 3, p. 439-453, Sep 2004.

WEISS, A. C.; KISPERS, A. Eph/ephrin signaling in the kidney and lower urinary tract. **Pediatr Nephrol**, 31, n. 3, p. 359-371, Mar 2016.

WEISS, M. M.; HERMSEN, M. A.; MEIJER, G. A.; VAN GRIEKEN, N. C. *et al.* Comparative genomic hybridisation. **Mol Pathol**, 52, n. 5, p. 243-251, Oct 1999.

WHITE, S.; OHNESORG, T.; NOTINI, A.; ROESZLER, K. *et al.* Copy number variation in patients with disorders of sex development due to 46,XY gonadal dysgenesis. **PLoS One**, 6, n. 3, p. e17793, 2011.

WILKIE, A. O.; CAMPBELL, F. M.; DAUBENEY, P.; GRANT, D. B. *et al.* Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of 2 cases and literature review. **Am J Med Genet**, 46, n. 5, p. 597-600, Jun 15 1993.

WILLATT, L.; COX, J.; BARBER, J.; CABANAS, E. D. *et al.* 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome. **Am J Hum Genet**, 77, n. 1, p. 154-160, Jul 2005.

WONG, B. K. Y.; SUTTON, V. R. Aicardi syndrome, an unsolved mystery: Review of diagnostic features, previous attempts, and future opportunities for genetic examination. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**, 178, n. 4, p. 423-431, Dec 2018.

YAO, G.; CHEN, X. N.; FLORES-SARNAT, L.; BARLOW, G. M. *et al.* Deletion of chromosome 21 disturbs human brain morphogenesis. **Genet Med**, 8, n. 1, p. 1-7, Jan 2006.

YATSENKO, S. A.; KRUEER, M. C.; BADER, P. I.; CORZO, D. *et al.* Identification of critical regions for clinical features of distal 10q deletion syndrome. **Clin Genet**, 76, n. 1, p. 54-62, Jul 2009.

ZAHIR, F.; FIRTH, H. V.; BAROSS, A.; DELANEY, A. D. *et al.* Novel deletions of 14q11.2 associated with developmental delay, cognitive impairment and similar minor anomalies in three children. **J Med Genet**, 44, n. 9, p. 556-561, Sep 2007.

ZAZO SECO, C.; PLAISANCIE, J.; LUPASCO, T.; MICHOT, C. *et al.* Identification of PITX3 mutations in individuals with various ocular developmental defects. **Ophthalmic Genet**, 39, n. 3, p. 314-320, Jun 2018.